

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

ANA MARIA RODRIGUES DA SILVA

**Análise da expressão de potenciais inflamassomas
envolvidos na quimiorresistência adquirida à cisplatina em
modelo *in vitro* de carcinoma de ovário seroso de alto grau**

VITÓRIA
2018

ANA MARIA RODRIGUES DA SILVA

**Análise da expressão de potenciais inflamassomas
envolvidos na quimiorresistência adquirida à cisplatina em
modelo *in vitro* de carcinoma de ovário seroso de alto grau**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Farmacologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Bioquímica.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Leticia Batista Azevedo Rangel

VITÓRIA

2018

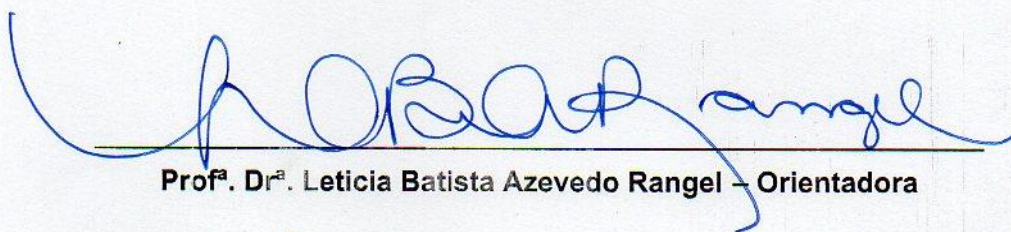
Ana Maria Rodrigues da Silva

“Análise da expressão de potenciais inflamassomas envolvidos na quimiorresistência adquirida à cisplatina em modelo *in vitro* de câncer de ovário seroso de alto grau”

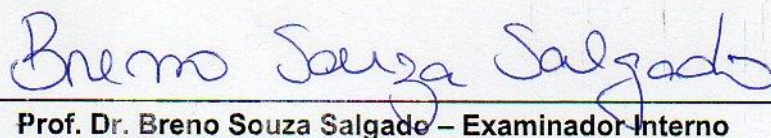
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovado(a) em 08 de outubro de 2018.

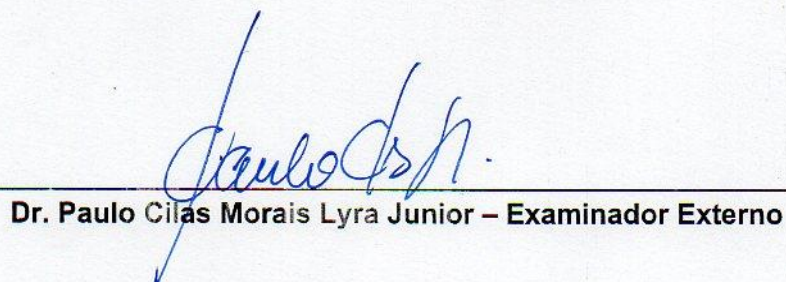
BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a Dr.^a Leticia Batista Azevedo Rangel – Orientadora



Prof. Dr. Breno Souza Salgado – Examinador Interno



Dr. Paulo Cilas Moraes Lyra Junior – Examinador Externo

Vitória/ES
2018

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas da Ufes para ser confeccionada pelo autor

R696a Rodrigues da Silva, Ana Maria, 1993-
Análise da expressão de potenciais inflamassomas
envolvidos na quimiorresistência adquirida à cisplatina em
modelo in vitro de carcinoma de ovário seroso de alto grau /
Ana Maria Rodrigues da Silva. - 2018.
93 f. : il.

Orientadora: Leticia Batista Azevedo Rangel.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Câncer de ovário epitelial. 2. Quimiorresistência. 3.
Cisplatina. 4. Inflamassoma. I. Batista Azevedo Rangel, Leticia.
II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
da Saúde. III. Título.

CDU: 61

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pois Ele é o motivo de todos os demais agradecimentos. Ele me sustentou e colocou anjos em minha vida. Anjos que agradecerei para sempre. Anjos que me fizeram companhia, que abriram portas, que me deram oportunidades, que me socorreram, que me corrigiram e que me amaram. E a todos esses anjos agradeço a seguir:

Agradeço à minha mãe, Maria Alda, que nunca mediu esforços para que eu sempre tivesse o melhor, bem como aos meus pais de criação, Tio Hélio e Tia Ane, por terem confiado em mim e, mesmo sem obrigação, dedicaram todo o amor do mundo. Sem eles, com certeza eu não estaria aqui. Agradeço também toda a minha família, incluindo Hedrei Henrique, porque são essenciais para mim.

Agradeço à minha orientadora por ter confiado em mim e ter investido tempo na minha formação, por ter compartilhado seu conhecimento e ter me concedido oportunidades para crescer.

Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório: Diandra, Taciane, Nayara, Alan, Paulo, Maria, Marcele e Géssica, por terem me recebido com tanto carinho e por terem sido pacientes em me ensinar. À minha amiga Diandra, um agradecimento especial, por ter sido meu porto seguro acadêmico na fase final de escrita desta dissertação.

Agradeço aos meus professores, colegas e amigos do mestrado pelo companheirismo e alegria de todas as aulas.

Agradeço ao laboratório do professor Ian Silva por ter fornecido espaço e reagentes necessários para alguns experimentos desse trabalho.

Agradeço aos técnicos e servidores da UFES, por terem sido solícitos quando precisei.

Agradeço aos meus amigos extra academia, que compreenderam todas as vezes em que me ausentei, em especial à minha amiga Jessyca Guerra por todo o apoio. Agradeço ao Criobanco e toda a equipe técnica na pessoa do Dr. Edgar Nascimento, do Fernando Rossi e da Rafaela Couto, por terem sido parceiros durante todo o meu mestrado.

Agradeço às agências de fomento CAPES, FAPES e CNPq pelo financiamento concedido, à Universidade Federal do Espírito Santo por me fornecer estrutura e condições de formação, ao Labiom e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia.

Agradeço ainda, ao professor Alexandre Bruni-Cardoso e toda a sua equipe, por terem aberto as portas do laboratório para que eu fizesse alguns experimentos. Também agradeço à professora Flávia Meotti pelos reagentes fornecidos.

Por fim, agradeço à banca examinadora, pelas contribuições ao aprimoramento e melhoria do presente trabalho.

“Qual é a vida bem-sucedida? Jesus impacta com sua resposta até hoje. A vida que de fato vale a pena, é a vida assumidamente dedicada ao outro. O sucesso da nossa vida não tem a ver com nosso próprio ganho ou com o nosso próprio conforto.

Jesus ensina que a vida que vale a pena é aquela que permite que o outro viva melhor com você, do que se você não existisse. Que o outro sorria o melhor sorriso que sem você não seria possível... Essa é a vida que vale a pena!”

Clóvis de Barros

RESUMO

O carcinoma de ovário seroso de alto grau (COS-AG) é a causa mais frequente de mortes entre malignidades ginecológicas. Devido ao seu desenvolvimento assintomático bem como à falta de métodos de triagem sensíveis e específicos, a doença é frequentemente diagnosticada em estádios avançados e incuráveis. Embora os tumores usualmente respondam bem à quimioterapia de primeira linha baseada em compostos de platina e taxanos, a maioria dos pacientes desenvolve recidiva e quimiorresistência. A inflamação desempenha um papel na iniciação e desenvolvimento de muitos tipos de cânceres, incluindo o COS-AG. Recentemente, complexos proteicos componentes do sistema imune inato, denominados inflamassomas, tem sido associado aos mecanismos de progressão e metástase de neoplasias, entretanto, o papel na quimiorresistência é pouco explorado. Nesse estudo, investigamos o significado clínico dos inflamassomas na modulação do fenótipo quimiorresistente em modelo de linhagem resistente à cisplatina (ACRP) a partir da linhagem parental de COS-AG (A2780), por RT-PCR e western blot. Nossos resultados mostraram que, embora a expressão do transcrito NLRP3 permaneça inalterada na linhagem resistente, a expressão proteica parece ser alterada de forma dose-dependente com o tratamento de cisplatina, contudo não configura ser o evento principal na quimiorresistência. Adicionalmente, verificou-se expressão aumentada do transcrito NLRP1 na linhagem ACRP, mas não de NLRC4. Em suma, nosso estudo foi o primeiro a demonstrar a relevância do inflamassoma NLRP1 no desenvolvimento e regulação da resistência à cisplatina em células de COS-AG, tornando-o alvo atraente com grande potencial terapêutico contra a doença.

Palavras chaves: Câncer de ovário epitelial, inflamassomas, quimiorresistência, cisplatina.

ABSTRACT

High-grade serous ovarian cancer (HGS-OC) is the most frequent cause of deaths among gynecological malignancies. Due to their asymptomatic development as well as the lack of sensitive and specific screening methods, the disease is diagnosed in advanced and incurable stages. Although tumors usually respond to first line taxanes and platinum-based chemotherapy, most patients develop relapse and chemoresistance. Inflammation has been involved in the initiation and development of many types of cancer, including HGS-OC. Recently, the protein components of the innate immune system, known as inflammasome, have been associated with the mechanisms of progression and metastasis of neoplasias, however, its role in drug-resistance is little explored. In this study, through RT-PCR and western blot analysis we investigated the clinical significance of inflammasomes in modulating the chemoresistant phenotype in cisplatin-resistant cells (ACRP) obtained from the parental line of HGS-OC (A2780). Our results have shown that, even though mRNA expression levels of NLRP3 remained unaltered in the ACRP, the NLRP3 protein expression appears to vary in a dose-dependent way with cisplatin treatment, although it does not configure the main event in chemoresistance. An increase in mRNA expression levels of the NLRP1, but not of NLRP4, in resistant cell line ACRP was also obtained. In conclusion, our study was the first to show the involvement of NLRP1 inflammasome in the development and regulation of cisplatin-resistance in HGS-OC cells, making it an attractive target with great therapeutic potential against the disease.

Key words: Epithelial ovarian cancer, inflammasomes, chemoresistance, cisplatin.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	13
	LISTA DE TABELAS	15
	LISTA DE ABREVIATURAS	16
1	JUSTIFICATIVA	19
2	INTRODUÇÃO	22
2.1	CARCINOMA OVARIANO	22
2.1.1	Carcinoma epitelial ovariano (CEO): classificação histológica e molecular ..	24
2.2	TRATAMENTO DO CEO	29
2.3	QUIMIORRESISTÊNCIA À CISPLATINA: POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO E MOLÉCULAS ASSOCIADAS AO FENÔMENOS	30
2.3.1	Inflamação: Inflamassomas	31
2.3.1.1	Inflamassomas no câncer	33
2.3.1.1.1	Inflamassoma NLRP3	34
2.3.1.1.2	Inflamassoma NLRC4	37
2.3.1.1.3	Inflamassoma NLRP1	37
2.3.2	Moléculas e mecanismos que modulam a quimiorresistência e a influência dos inflamassomas	38
3	OBJETIVOS	42
3.1	OBJETIVO GERAL	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	LINHAGENS CELULARES, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR	43

4.2	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA E CÁLCULO DA IC ₅₀ ESTIMADA.....	43
4.3	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	44
4.4	REAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA DE REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA COM cDNA (qRT-PCR)	44
4.5	IMMUNOBLOTTING	45
4.5.1	Preparo das amostras	45
4.5.2	Corrida Eletroforética	45
4.5.3	Western-Blot	46
4.6	4.6 CULTURA TRIDIMENSIONAL	46
4.6.1	4.6.1 Tratamento de placas de cultura de células com PolyHEMA e posterior ensaio com células dispostas em 3D	47
4.6.2	Tratamento de placas de cultura de células com matrigel e posterior ensaio com células dispostas 3D	47
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	ANÁLISES EM CULTURA BIDIMENSIONAL	49
5.1.1	Estabelecimento da linhagem resistente: a ACRP é 5,265 Mais resistente à cisplatina que a A2780	49
5.1.2	O inflamassoma NLRP3 parece contribuir apenas parcialmente para a aquisição do fenótipo quimiorresistente da ACRP	52
5.1.3	O transcrito ASC corrobora com a sugestão da ação de outros NLRPs na resistência adquirida pela ACRP	55
5.1.4	O inflamassoma NLRC4 também não se mostrou importante para a resistência da ACRP	56

5.1.5	A superexpressão do inflamassoma NLRP1 sugere forte correlação deste inflamassoma com a resistência da ACRP à cisplatina	58
5.1.6	A expressão aumentada de bcl-2 na ACRP contribui para a influência do inflamassoma NLRP1 na quimiorresistência adquirida	59
5.1.7	Os transcritos do Tp53 e NF-kB apotam pouca relação destes à aquisição da resistência à cisplatina pela ACRP	61
5.1.8	O transcrito da IL1 β intracelular não apontou diferença entre as linhagens estudadas	64
5.1.9	A expressão proteica da caspase 1 ativada aponta para a atuação dos inflamassomas na resistência adquirida da ACRP à cisplatina	66
5.1.10	A linhagem sensível a cisplatina formou colônias maiores e em maior número no controle	69
5.2	ANÁLISES EM CULTURA TRIDIMENSIONAL	70
6	CONCLUSÃO	75
7	PERSPECTIVAS	78
8	REFERÊNCIAS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativas de câncer no Brasil para o biênio 2018-2019.....	22
Figura 2 - Estimativas de câncer nos Estados unidos para 2018.....	23
Figura 3 - Classificação do CO em relação à sua etiologia.....	24
Figura 4 - Etiologia do CEO de acordo com o modelo proposto por VAUGHAN e colaboradores em 2011.....	26
Figura 5 - Classificação molecular do CEO como tipo I ou tipo II.....	27
Figura 6 - Esquema representando uma típica ativação de um NLRP.....	34
Figura 7 - Ligantes que podem ativar o inflamassoma NLRP3.....	36
Figura 8 - Estabelecimento da ACRP resistente à cisplatina.....	50
Figura 9 - Viabilidade celular metabólica e IC ₅₀ estimada.....	51
Figura 10 - Expressão do transcrito NLRP3.....	53
Figura 11 - Expressão da proteína NLRP3 de 118KDa.....	54
Figura 12 - Expressão do RNA mensageiro do gene ASC.....	56
Figura 13 - Expressão do transcrito NLRC4.....	57
Figura 14 - Expressão do RNA mensageiro do gene NLRP1.....	58
Figura 15 - Expressão do transcrito Bcl-2.....	60
Figura 16 - Expressão do RNA mensageiro de Tp53.....	62
Figura 17 - Expressão do RNA mensageiro do NF- κ B _{p65}	63
Figura 18 - Expressão do RNA mensageiro da IL1 β	65
Figura 19 - Expressão do RNA mensageiro do IL1R.....	66
Figura 20 - Expressão da proteína caspase 1 menos ativada de peso molecular de 47KDa.....	67

Figura 21 - Expressão da proteína caspase 1 mais ativada de peso molecular de 20KDa.....	68
Figura 22 - Ensaio de formação de colônias.....	69
Figura 23 - Cultura 3D OnTop.....	70
Figura 24 - Cultura 3D em polyHEMA.....	71
Figura 25 - Expressão do RNA mensageiro do gene NLRP3 na cultura 3D.....	72
Figura 26 - Expressão do RNA mensageiro do gene IL-1 β na cultura 3D.....	72
Figura 27 - Expressão do RNA mensageiro do gene IL1R na cultura 3D.....	73
Figura 28 - Modelo gerado a partir dos nossos resultados	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos iniciadores (primers) utilizados no qPCR	45
Tabela 2 - Lista dos anticorpos primários utilizados nos experimentos de “blot” para análise de expressão proteica	46

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU – 5- Fluorouracil

ACS – Sociedade Americana do câncer

APAF-1 - Fator de ativação de protease apoptótica 1

ASC – Proteína adaptadora do domínio CARD associada a apoptose

BAK – Proteína pró-apoptótica pertencente à família BCL-2

BAX - Proteína pró-apoptótica pertencente à família BCL-2

BCL-2 - Linfoma de células B2

BCL-2 – Proteína anti-apoptótica pertencente à família BCL-2

BCL-XL - Proteína anti-apoptótica pertencente à família BCL-2

BCL-XW - Proteína anti-apoptótica pertencente à família BCL-2

BID- Proteína pró-apoptótica pertencente à família BCL-2

BRAF - Serina/treonina cinase pertencente à família B-Raf

BRCA1/2 – Gene 1 e 2 de susceptibilidade ao câncer de mama

CA-125 - Antígeno do câncer

CEO- Carcinoma epitelial de ovário

CO – Carcinoma ovariano

COS-AG –Câncer de ovário seroso de alto grau

CARD – Domínio recrutador de caspase

CASP 1 - Caspase 1

CISP- Cisplatina

DAMPs – Padrões moleculares associado aos danos

DMSO- Dimetilsulfóxido

EGF - Fator de crescimento epidermal

EGFR - Receptor de fator de crescimento epidermal

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HER2 - Receptor do fator de crescimento epidermal humano do tipo 2

IL - Interleucina

INCa – Instituto Nacional do Câncer

KRAS- Oncogene homólogo ao oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten

LOXs – Lisil oxidades

LRR – Repetições ricas em leucina

MDM-2 “Murine double minute 2” - Regulador negativo do supressor de tumor P53

MDP – Peptídeo muramil

MMPs - Metaloproteinases

mRNA - RNA mensageiro

NF-kB - Fator de transcrição kappa B

NLR – Receptor nod-like

NLRC4 - Proteína contendo o domínio CARD 4

NLRP1 - Proteína 1 contendo os domínios NACHT, LRR e PYD

NLRP3 – Proteína 3 contendo os domínios NACHT, LRR e PYD

OSCC – Carcinoma oral de células escamosas

p53 - Proteína tumoral p53

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PI3KCA - Subunidade catalítica alfa da fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinase

PolyHEMA - 2-hidroxietil methacrilate

PTEN - Gene homólogo à tensina e fosfatase

PYD – Domínio pirina

qRT-PCR – Reações em cadeia e com uso de transcriptase reversa em tempo real

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RPMI – “Roswell Park Memorial Institute médium” - Meio de cultura usado

STICS - Carcinoma seroso intra-epitelial tubal

TBS - Solução salina tamponada com Tris

TBS -T- Solução salina tamponada com Tris acrescido Tween 20

TEM - Transição epitélio-mesenquimal

TIMPs – Inibidores teciduais de metaloproteinases

TLR4 - Receptor do tipo toll 4

TP53- gene supressor de tumor que codifica a proteína P53

VEGF - Fator de crescimento endotelial

1 JUSTIFICATIVA

O carcinoma ovariano (CO) é o oitavo câncer mais incidente entre as mulheres no Brasil (INCa, 2018) e nos Estados Unidos da América sua estatística é demasiadamente preocupante visto que, em detrimento à sua diminuta incidência, ocupa a quinta posição na taxa de mortalidade (ACS, 2018).

Dentre as subclassificações do CO, os tumores epiteliais são os mais incidentes independente da etnia (ACS, 2018). Eles congregam grupos heterogêneos de tumores que apenas compartilham um local anatômico comum (BAST et al., 2009; MUINAO et al, 2018).

O carcinoma epitelial de ovário (CEO), pode ser dividido molecularmente em tipo I e tipo II. Os tumores do tipo I são de crescimento lento e indolentes, englobando carcinomas serosos de baixo grau os quais podem derivar da progressão de adenoma para tumores “borderline” e, enfim para os mesmos, endometrióide de baixo grau, mucinosos e de células claras. Esses tumores são caracterizados por mutações no gene homólogo ao oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten (KRAS), proteína cinase serina/treonina pertencente à família B-RAF (BRAF), subunidade catalítica alfa da fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato3-cinase (PIK3CA), bem como diminuição na expressão PTEN e ativação constitutiva da via de MAPK. Ainda, há mutações no gene ARID1A e aumento na expressão de (HNF1) e (IGF-1). Ademais, apresentam mutações em interleucinas (-1, -6, -8) e citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (Revisado por KOSHIYAMA; MATSUMURA; KONISHI, 2014, KURMAN; SHIH, 2010). Fato marcante é a taxa reduzida de mutações no gene *TP53* e perfil de metilação do DNA distinto daquele observado em COS-AG (Revisado por KOSHIYAMA; MATSUMURA; KONISHI, 2014, KURMAN; SHIH, 2010).

Por outro lado, os tumores do tipo II são altamente agressivos e compreendem os carcinomas de ovário seroso de alto grau (COS-AG) como representantes típicos, bem como carcinomas endometrióides e indiferenciados de alto grau com alta ocorrência de mutações em *TP53* (Revisado por KOSHIYAMA; MATSUMURA; KONISHI, 2014, KURMAN; SHIH, 2010). As alterações genéticas dos COS-AG são diversas e incluem, dentre outras: i) elevada taxa de aneuploidia; ii) incidência marcante de rearranjo cromossômico em função da magnitude da instabilidade

gênica de seus cromossomos; iii) superexpressão de *TP53* (80%), *Ki67* (50%-75%), *HER2* (20%-67%), *AKT* (12%), *HLA-G* (61%) e *APOE* (66%) (Revisado por KOSHIYAMA; MATSUMURA; KONISHI, 2014). Adicionalmente, pelo menos 50% dos casos de COS-AG são marcados por hipermetilação do DNA e aumento da atividade de clones de células tronco tumorais sucedendo a inibição de *TP53* e *Rb1* (Revisado por KOSHIYAMA; MATSUMURA; KONISHI, 2014). Há, também, disfunção em *BRCA1* e 2. Na verdade, entre 10% a 15% dos casos de COS-AG são hereditários, dentre os quais 90% apresentam mutações de alta penetrância em *BRCA1* e 2.

O COS-AG tem despertado a atenção pela agressividade e menor sobrevida livre de doença nas pacientes. Tais fatos, podem ser explicados pela inexistência de marcadores específicos e, principalmente, à ausência de sinais e sintomas patognomônicos nos estádios iniciais da doença. Além disso, o COS-AG apresentam alta taxa de quimiorresistência quando tratados com derivados de platina (PAES et al., 2011), tal a classificar COS-AG como o segundo câncer ginecológico mais letal no Brasil (INCa, 2018).

A aquisição do fenótipo quimiorresistente está associado a diversos fatores, dentre eles o microambiente tumoral (SHERMAN-BAUT et al., 2003). Consta na literatura, evidências consubstanciadas acerca do papel crucial do microambiente tumoral na tumorigênese, bem como para a progressão tumoral (BISACCHI et al., 2003, BACHVAROV et al., 2006). Este compreende a interação de células cancerosas com matriz extracelular, células do sistema imunológico, hormônios, fatores de crescimento e citocinas anti e pró-inflamatórias (BLANKENSTEIN, 2005; CHO et al., 2011; Revisado por WANG et al., 2018). Dentre os componentes do microambiente tumoral, a interleucina1 β (IL1 β) tem se destacado pela sua participação na progressão maligna e na ocorrência de metástase em diversos tipos tumorais, tais como câncer pancreático, mamário, ovariano e melanoma (ELARAJ et al., 2006; ESQUIVEL-VELÁZQUEZ et al., 2015; WOOLERY et al., 2015). Estudo conduzido por Ahmad e colaboradores (2003) mostrou que, no melanoma, a liberação exacerbada da IL1 β promoveu migração celular por meio da superativação do complexo multiproteico denominado inflamassoma. O fato foi mediado por receptores de membrana, como os receptores do tipo Toll (TLRs), mecanismo por intermédio do qual a IL1 β pode adentrar a célula, ativando diversas moléculas como


o fator de transcrição kappa B (NF-kB). Como consequência, observa-se retroalimentação positiva e provável progressão do tumor (VORONOV; APTE, 2015; SPANDANA et al., 2018).

Diante do exposto, faz-se imperativo compreender o papel dos inflamassomas no COS-AG, analisando a função dos mesmos na modulação de vias importantes relacionadas à progressão, à metástase e à aquisição do fenótipo quimiorresistente à cisplatina (tratamento ouro contra a doença em associação com taxano) pelas células tumorais desta doença que segue desafiando pesquisadores e clínicos. Tomados em conjunto, os resultados do presente trabalho destacam a importância dos inflamassomas NLRP1, NLRP3 e da caspase 1 na quimioresistência adquirida à cisplatina na linhagem de COS-AG, representada pela ACRP.

2 INTRODUÇÃO

2.1 CARCINOMA OVARIANO

O CO é o sétimo câncer mais comum que acometem as mulheres. Representando 3,6% dos tumores femininos (INCa, 2018) sua letalidade tende a ser mais elevada em comparação aos outros tipos de câncer dos órgãos reprodutores femininos (FERLAY et al., 2013). Em 2012, foram esperados 239 mil novos casos no mundo, o que corresponde a um risco estimado de 6,1 a cada 100 mil mulheres (INCa, 2018), e nos últimos anos essa incidência do CO tem aumentado drasticamente (TORRE et al., 2012). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCa) apontou 6.150 novos casos para cada ano do biênio 2018-2019, tornando-o o oitavo câncer mais prevalente entre as mulheres, excetuando-se o câncer de pele não melanoma (Figura 1) (INCa, 2018).



	Localização Primária	Casos	%
Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
	Cólon e Reto	18.980	9,4%
	Colo do Útero	16.370	8,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
	Estômago	7.750	3,8%
	Corpo do Útero	6.600	3,3%
	Ovário	6.150	3,0%
	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
	Leucemias	4.860	2,4%

Figura 1: Estimativas de câncer no Brasil para o biênio 2018-2019. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para cada ano do biênio 2018-2-19 para o sexo feminino, no Brasil, exceto pele não melanoma (INCa, 2018).

Nos Estados Unidos, embora os dados para este mesmo ano não elenquem o CO entre os dez mais incidentes na população feminina, a doença está correlacionada à situação alarmante, ocupando a quinta posição dentre os cânceres com maior índice de mortalidade (ACS, 2018), sendo estimados, para 2018, 14.070 óbitos causados pelo CEO anualmente (Figura 2).

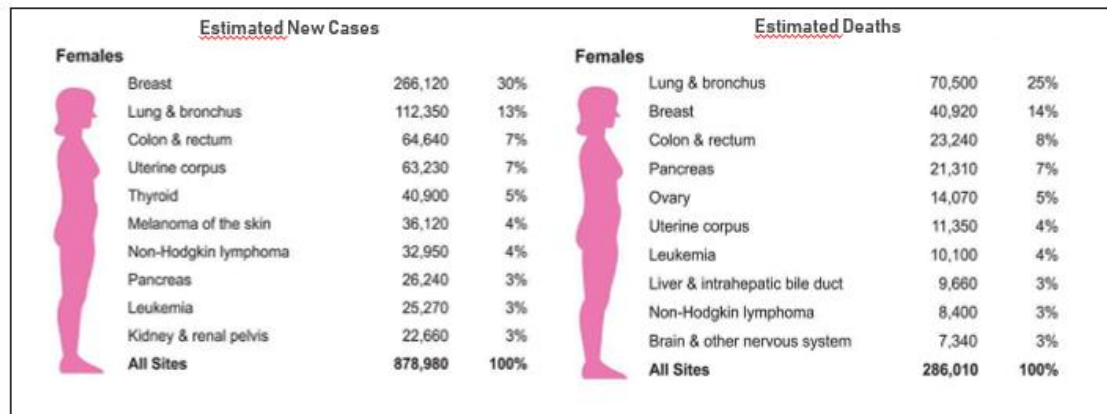


Figura 2: Estimativas de câncer nos Estados Unidos para 2018. Dez principais tipos de câncer para os novos casos estimados e de mortes na população feminina dos Estados Unidos, 2018 (American Cancer Society, 2018).

Histologicamente, os CO são divididos em tumor de células germinativas, que se desenvolvem por meio da produção de ovócitos ou óvulos; tumor de células estromais, sendo este subtipo o mais raro deles tendo sua origem a partir de células do tecido conjuntivo que mantém a estrutura ovariana e onde são produzidos os hormônios femininos, estrogênio e progesterona. Ainda, existem os tumores epiteliais que dentre as divisões histológicas supracitadas representam 98% dos casos diagnosticados (PRAT, 2014) (Figura 3).

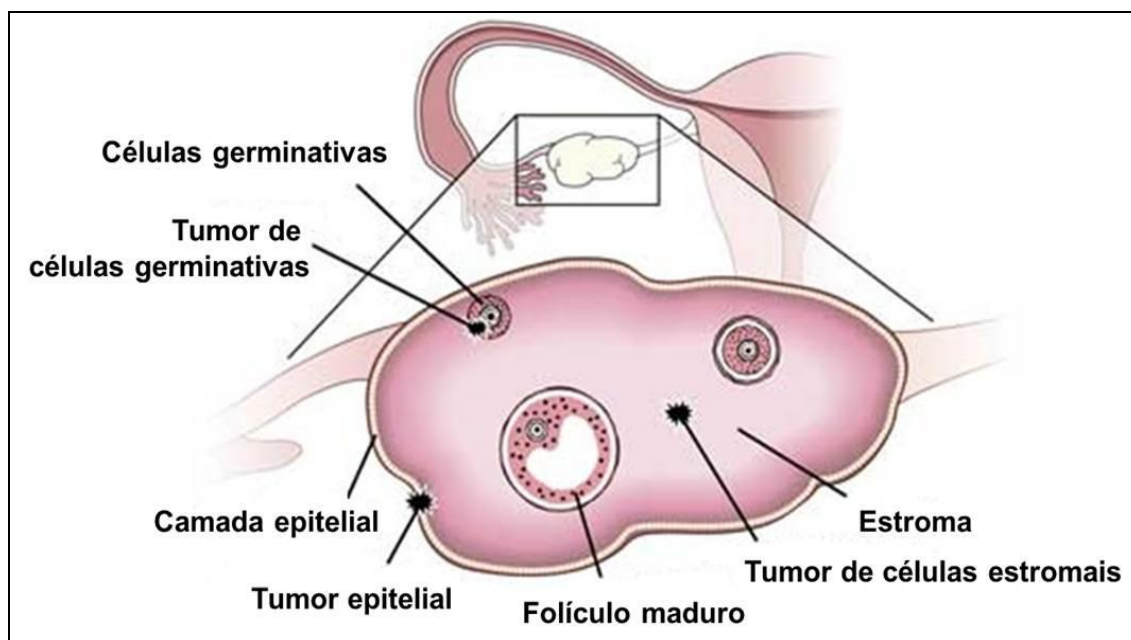


Figura 3 – Classificação do CO em relação à sua etiologia. Inicialmente, os tumores ovarianos podem ter origem epitelial, quando são formados a partir de células epiteliais; germinativas, originados a partir de ovócitos ou óvulos e estromais, a partir de células do estroma. Adaptado de ALGECIRAS-SCHIMNICH, 2013.

2.1.1 Carcinoma epitelial ovariano (CEO): classificação histológica e molecular

Devido à inexistência de marcadores específicos e, principalmente, à ausência de sinais e sintomas patognomônicos nos estádios iniciais da doença, o CEO está associado à alta taxa de mortalidade das pacientes acometidas pelo mesmo. Além disso, à ineficiência das abordagens terapêuticas disponíveis contra a doença e a quimiorresistência das células tumorais, diminuem a sobrevida livre da doença das pacientes.

No que tange à quimiorresistência, é digno de nota que, no Brasil, aproximadamente 80% dos CEO tratados com derivados de platina adquirem o fenótipo referido (PAES et al., 2011), tal a classificá-lo como o segundo câncer ginecológico mais letal (INCa, 2018, NEZHAT et al., 2015; PRAT, 2014).

Historicamente, a agressividade do CEO está associada, dentre outros fatores, à inexistência de métodos diagnósticos eficazes; logo, à detecção tardia da doença (LI et al., 2012). De fato, se detectado precocemente, o CEO é usualmente responsivo à quimioterapia, tal que as pacientes portadoras de CEO apresentam taxa de sobrevida em torno de 80-90%. Entretanto, como a maioria das mulheres é diagnosticada em estádios avançados e metastáticos da doença, circunstância em que as células tumorais já adquiriram fenótipo pan-quimiorresistente aos antineoplásicos disponíveis na clínica, a taxa de sobrevida das pacientes cai a valores próximos a 10% (MODUGNO; EDWARDS, 2012).

A ideia contemporânea compartilhada por pesquisadores e clínicos é que o CEO coliga doenças moleculares e etiologicamente distintas que compartilham o mesmo local anatômico, os ovários (VAUGHAN, 2011; BAST et al., 2009).

Histologicamente, o CEO pode ser classificado em mucinoso (3%), o qual advém do estômago, cólon e apêndice; endometrióide (10%), derivado da menstruação retrógrada e da endometriose; células claras (10%), formado a partir de células endometriais e uterinas; seroso de alto grau (COS-AG) (70%) que se origina da monocamada epitelial do ovário e da junção do epitélio da tuba de falópio e da tuba serosa (Revisado por KOSHIYAMA; MATSUMURA; KONISHI, 2014; INCa, 2018) e o seroso de baixo grau, o qual parece ter início a partir do tecido epitelial superficial do ovário (VAUGHAN et al., 2011; RAMALINGAM, 2016; TEMKIN et al., 2017) (Figura 4).

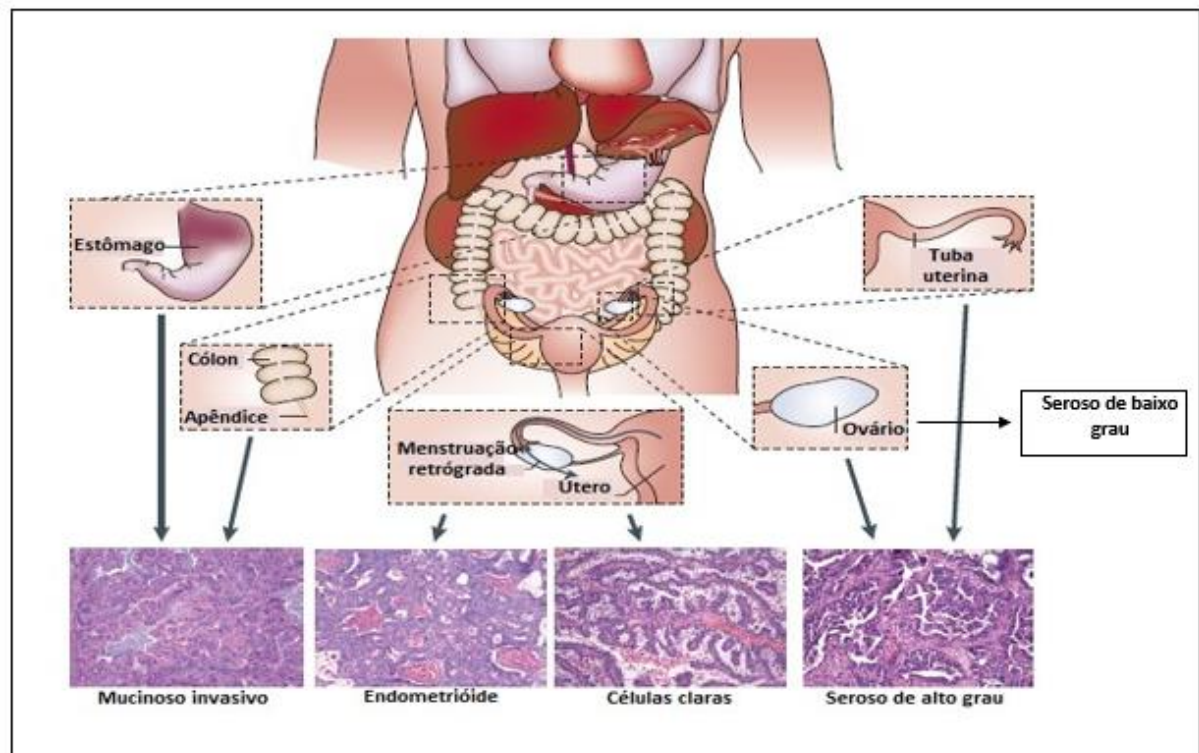


Figura 4: Etiologia do CEO de acordo com o modelo proposto por VAUGHAN e colaboradores em 2011. CEO congrega várias doenças que se desenvolvem no ovário. Neste contexto, CEO mucinoso invasivo se origina no estômago, no cólon e/ou no intestino; endometrióide, da menstruação retrógrada e/ou do endométrio; de células claras, do endométrio; COS-AG, da tuba de falópio e do tecido epitelial superficial ovariano e seroso de baixo grau, do epitélio superficial ovariano. Adaptado de VAUGHAN et al., 2011.

A caracterização molecular do CEO subsidiou tecnicamente o estabelecimento de esquema de classificação simplificado da doença, este trazendo implicações sobre a patogênese e o prognóstico da mesma. Nesse contexto, Kurman & Shih (2016) propuseram modelo dualístico que classifica os diversos subtipos de CEO em dois grandes grupos: i) CEO tumores do tipo I, os quais abrangem carcinoma seroso de baixo grau, endometrióide, de células claras, mucinoso, tumor maligno de Brenner e adenocarcinoma seromucinoso; ii) CEO tumores do tipo II que congregam carcinoma seroso de alto grau, carcinosarcoma e carcinoma indiferenciado (Figura 5). A classificação de CEO supramencionada apresenta tumores malignos de origem tecidual distinta, além de diferenças genéticas, moleculares e morfológicas. Em geral, CEO do tipo I estão associados a alterações moleculares distintas pouco encontradas em tumores do tipo II, como mutações em *BRAF*, *KRAS*, receptor do

fator de crescimento epidermal humano do tipo 2 (*HER2*), gene homólogo à tensina e à fosfatase (*PTEN*), dentre outros (DELLA PEPA et al., 2015; DUCIE et al., 2017; LABIDI-GALY et al., 2017). Em contraste, os CEO do tipo II, que geralmente são detectados em estágio avançado (III e IV), são clinicamente mais agressivos, revelam geralmente alto grau de instabilidade genômica e são caracterizados por mutações em *TP53* em aproximadamente 98% dos casos COS-AG diagnosticados (KURMAN, 2013; KESSLER et al., 2013; DUCIE et al., 2017). Note que outras características genéticas marcantes dos CEO do tipo II foram previamente discutidas neste trabalho.

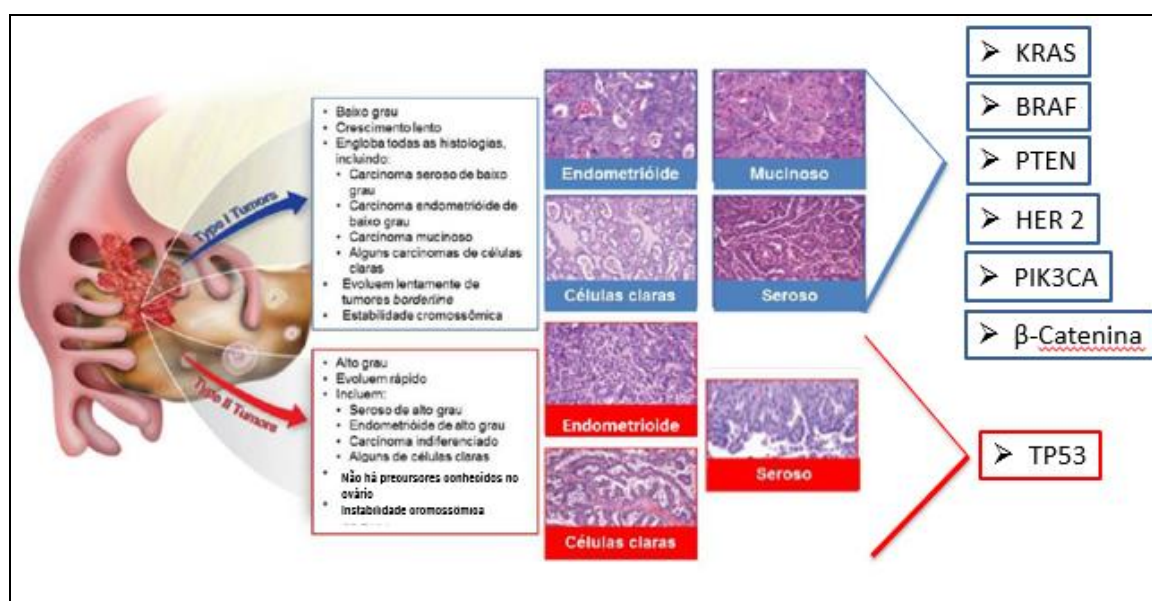


Figura 5: Classificação molecular do CEO como tipo I ou tipo II. Os principais subtipos histológicos do CEO se enquadram em duas subclassificações. Os tumores do tipo I são carcinomas de crescimento lento e indolente de baixo grau que tipicamente surgem de lesões precursoras bem reconhecidas (tumores limítrofes) e que se desenvolvem a partir do epitélio da superfície ovariana, cistos de inclusão ou endometriose. Em contraste, os tumores do tipo II são carcinomas de alto grau com elevado potencial mitótico e rápido crescimento celular. Normalmente, os tumores referidos progridem para doença metastática e quimiorresistente distante do ovário, fatos associados ao prognóstico ruim da mesma. Adaptado de JONES & DRAPKIN, 2013.

Dentre os tumores do tipo II, os COS-AG representam os tumores mais agressivos. Afim de compreender melhor as características dos COS-AG, Pick e colegas (2013)

e Nik e colaboradores (2014) apontaram evidências consubstanciadas que suportam a hipótese supracitada, a saber: i) mais de 50% dos COS-AG apresentam assinatura gênica similar ao carcinoma intraepitelial tubular seroso (STIC); ii) 10% a 15% dos STICs retirados profilaticamente de mulheres continham *BRCA 1/2* mutados, sendo esses genes supressores de tumor associados à susceptibilidade aos cânceres familiares de mama e de ovário, mas que também são suscetíveis às mutações somáticas em ambas as doenças; iii) 92% dos STICs continham mutação em TP53 tal qual acontece nos COS-AG; iv) produções de oncogenes como ciclina E1, fator de remodelação e espaçamento 1 (Rsf-1), bem como de sintase de ácidos graxos foram detectados nos STICs, sendo também superexpressos em COS-AG;) STICs foram detectados em peças cirúrgicas derivadas de salpingectomia profilática realizada em pacientes livres de CEO, evidenciando fortemente o fato de que os STICs são lesões precursoras, e não metástases, do COS-AG (BOWTELL, 2010). Discorrendo de modo pouco mais pormenorizado, inicialmente, surgem os SCOUTs (“secretory cell outgrowths”), cujas características genéticas incluem, dentre outras, expressão diminuta de *PTEN*, *TP53* e *Ki67* (CHEN et al., 2010). Estes progridem para STILs (“transitional intraepithelial lesions”) e, subsequentemente, para TILTs (“transitional intraepithelial lesions of the tube”) nas quais se observou assinatura proliferativa associada às mutações de p53, resultando em displasia atípica da tuba. Então, o processo segue para o aparecimento de STICs, lesões cujos cromossomas apresentam telômeros mais curtos do que aqueles dos COS-AG. Cumpre salientar que o fato é de extrema relevância clínica posto que configura aspecto que assegura que os STICs não são metástases de tumores tubários no ovário, mas sim lesões precursoras dos mesmos. De fato, a característica referida parece ser peculiar às lesões precursoras de tumores epiteliais (Revisado por KOSHIYAMA; MATSUMURA; KONISHI, 2014).

Dado o perfil epidemiológico do CEO, nossos esforços têm sido devotados para o aprofundamento do estado-da-arte do conhecimento sobre a doença, focando especialmente no COS-AG.

2.2 TRATAMENTO DO CEO

O tratamento cirúrgico é, usualmente, a primeira estratégia terapêutica de combate ao CEO. Entretanto, o procedimento varia, sobretudo, com o estadiamento do tumor. Geralmente, o diagnóstico da doença em estadios iniciais envolvem a remoção dos ovários e/ou das tubas de falópio. Por outro lado, a detecção da doença em estadios avançados, como acontece na maioria dos casos diagnosticados de COS-AG, é indicativa de histerectomia total, remoção de gânglios linfáticos adjacentes e da remoção de fragmentos dos órgãos com metástase da moléstia primária (National Collaborating Center for Cancer, 2011).

Há aproximadamente 30 anos, foi introduzida a quimioterapia de combate ao CEO baseada em derivados de platina. O marco posterior no tratamento da doença foi a introdução de taxanos adicionados ao regime quimioterápico supracitado; fato ocorrido no início dos anos 90 (MOR; ALVERO, 2013). As pacientes com doença avançada geralmente são tratadas com seis a oito ciclos de paclitaxel ou docetaxel e carboplatina. Essas pacientes apresentam taxa de reposta inicial ao tratamento de aproximadamente 75%. No entanto, a sobrevida livre de progressão varia de 16 a 21 meses, e a resistência a terapias baseadas em platina frequentemente se desenvolve (MUNROE; KOLESAR, 2016).

Nas últimas duas décadas, devido à alta taxa de recidiva do CO a pesquisa concentrou-se no potencial de novas estratégias de manutenção do tratamento com a finalidade de observar potenciais mudanças na evolução da doença, melhorando a sobrevida das pacientes. Dentre essas estratégias podemos exemplificar a utilização de gencitabina; topotecana; ciclofosfamida lipossomal e etoposídeo (GORE et al., 2001; BRUCHIM et al, 2016). Todavia, a associação das terapêuticas supracitadas é limitada devido a substancial toxicidade inerente e por não representa avanço clínico significativo.

Ainda, o avanço científico permitiu a introdução de alternativas componentes do arsenal terapêutico contra o CEO, dentre elas o uso de anticorpos monoclonais como o bevacizumab para conter a angiogênese (ARAVANTINOS; PECTASIDES, 2014; COLOMBO et al., 2016; MUNROE; KOLESAR, 2016).

Não obstante ao avanço no âmbito terapêutico, o principal tratamento permanece a cirurgia citorrredutora seguida de quimioterapia à base de platina e taxanos (BOOKMAN et al., 2009; BORLEY et al., 2012; JIN et al., 2018). Contudo, não há uma terapia padrão de segunda linha para pacientes com doença resistente à platina (DU BOIS et. al., 2003; LIU et al., 2017).

Conquanto ao progresso no estado-da-arte do conhecimento acerca do tratamento do CEO, a taxa de mortalidade associada à doença segue em caráter ascendente. Dito isto, O Ministério da Saúde do Brasil publicou, em 2012, a Portaria no. 458, a qual elenca o CEO como doença prioritária, não mais negligenciada, e estabelece critérios e condutas para lidar com mazela de tamanho impacto sócio-econômico e psicológico. Postula-se, portanto, que o tratamento das pacientes com CEO urge por abordagens terapêuticas inéditas e/ou alternativas com fins à promoção de qualidade de vida às doentes, especialmente para as doentes cujas células tumorais adquiriram fenótipo pan-resistente aos quimioterápicos disponíveis clinicamente.

2.3 QUIMIORRESISTÊNCIA À CISPLATINA: POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO E MOLÉCULAS ASSOCIADAS AO FENÔMENO

O mecanismo de ação dos derivados de platina, como é o caso da cisplatina, consiste no estabelecimento de ligação covalente com componentes do sulco maior no DNA, formando adutos por meio de ligações intra- e intercadeias e, por fim, induzindo alterações estruturais no DNA (PIECHOTA et al., 2005; WILMES et al., 2015). Essas consistem no surgimento de tauto-isômeros e o consequente pareamento errôneo entre as bases nitrogenadas do DNA. O resultado do evento referido é a distorção da dupla-hélice do DNA em função da alteração angular e, então, sua ruptura. Se por um lado, o principal alvo de ataque da cisplatina é o N7 da guanina do DNA, outros alvos já foram identificados, incluindo átomos de nitrogênio, oxigênio e fosfato de moléculas de DNA, RNA e proteínas (KELLAND, 2007; BASU; KRISHNAMURTHY, 2010; DASARI; TCHOUNWOU, 2014).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar o fenômeno de quimiorresistência, especialmente à cisplatina que parece ter peculiaridades quando comparada a outros agentes antineoplásicos, incluindo a redução da captação do

fármaco, a alteração do alvo do fármaco, a indução de mecanismos expulsão de fármacos, a ativação de mecanismos de reparo ao DNA, por remodelamento da matriz extracelular, a insensibilidade à morte celular induzida pelo fármaco, dentre outros (GOTTESMAN et al., 2002; LONGLEY et al., 2005; HOLOHAN et al., 2013; SHERMAN-BAUST et al., 2013). Em suma, pode-se citar, com veemência, que a aquisição do fenótipo resistente à cisplatina por células tumorais configura fenômeno multifatorial. Entretanto, cumpre destacar que recentemente a inflamação tem ganhado crescente relevância na biologia tumoral, visto que o remodelamento da resposta inflamatória envolve a secreção autócrina ou parácrina de interleucinas que, por sua vez, induz regulação da expressão gênica envolvendo, entre outras, moléculas responsáveis pelo surgimento da resistência a drogas antineoplásicas (MATASSA et al., 2016; MAIURI et al., 2018).

2.3.1 Inflamação: Inflamassomas

A associação entre inflamação e desenvolvimento do câncer recebeu recentemente amplo reconhecimento como marca do câncer (HANAHA; WEINBERG, 2011). A inflamação persistente contribui para a progressão do câncer, promovendo a sobrevivência do tumor, proliferação, angiogênese, metástase e evasão imune (GAO et al., 2014). Os processos envolvidos na inflamação associada ao câncer envolvem interações complexas entre as células tumorais e o microambiente tumoral.

A IL1 β é uma importante molécula mediadora do processo inflamatório que tem sido protagonista em diversos estadios do câncer. Voronov e colaboradores (2003), demonstraram que camundongos knockout para IL1 β falharam em desenvolver tumores sólidos após a injeção de células de melanoma e exibiram significativamente melhor sobrevida em comparação com animais do tipo selvagem, que morreram devido a metástases pulmonares. No microambiente tumoral, a função exercida pela IL1 β , bem como do seu receptor (IL1R) são fatores contribuintes para a angiogênese, adesão de células tumorais e invasão na matriz extracelular (MEC) (VORONOV et al., 2003; SWAI et al., 2003).

A presença da IL1 β também tem sido associada como um agente importante na resistência a quimioterápicos (SWAI et al., 2003; CHUNG et al., 2017; MENDOZA-RODRÍGUEZ et al., 2017; TULOTTA; OTTEWELL, 2018). Neste contexto, devido à

quimioterapia, diversas vias imunes inatas podem interagir com componentes celulares liberados das células tumorais (GONZALEZ-GUGEL et al., 2016) tornando a IL1 β um link interessante entre a inflamação e a aquisição do fenótipo quimiorresistente aos quimioterápicos no CEO e no seu subtipo COS-AG (CLENDENEN et al., 2011; MAIURI; O'HAGAN, 2016; SAVANT et al., 2018).

A IL1 β é uma citocina secretada e sintetizada por muitos tipos de células, incluindo monócitos, macrófagos teciduais e também por células epiteliais na forma de pro-IL1 β de 31 kDa, que é clivado pela enzima conversora de IL1 β ou caspase 1 para gerar a proteína madura de 17 kDa (JIM et al., 1997; BRADDOCK; QUINN, 2004).

A caspase 1 é uma proteína que além de ativar a IL1 β pode promover a morte celular por caspase conhecida por piroptose. São proteases que utilizam resíduos de cisteína do sítio ativo para clivar proteínas alvo após resíduos de aspartato (MIÃO et al., 2011). A caspase 1 é ativada por recrutamento de uma plataforma molecular denominada inflamassoma. Estudos recentes têm destacado o papel dos inflamassomas como um complexo proteico iniciando cascatas de sinalização de ventos inflamatórios (KARAN et al., 2017).

Conceitualmente, os inflamassomas constituem importantes componentes da resposta imune inata e são caracterizados por conjunto de proteínas que se oligomerizam no citoplasma das células em resposta a diversos estímulos fisiológicos, bem como à sinalização patogênica. Atualmente, os complexos inflamassomas mais conhecidos são classificados em diferentes subtipos de acordo com suas características estruturais em: receptores semelhantes a domínios de ligação à nucleotídeo (NLRs); ausentes em melanoma II (AIM2) e pirinas (MARTINON et al., 2002; CHOUBEY, 2016; SHARMA; KANNEGANTI, 2016).

Os NLRs, subtipos mais estudados e melhor caracterizados, pertencem a receptores de reconhecimento de padrões do hospedeiro (PRRs), os quais reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e a danos (DAMPs) (LAMKANFI; DIXIT, 2014; Revisado por KANTANOTO, 2017). Estes PRRs podem ser encontrados na superfície da membrana, como os receptores do tipo Toll (TLRs) ou intracelularmente, por exemplo, receptores do tipo NOD (NLRs) (Revisado por THI; HONG, 2017).

Adicionalmente, as proteínas NLR consistem em 3 domínios principais: um domínio de interação proteína-proteína N-terminal, um domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo médio (NACHT) e uma repetição rica em leucina (LRR) na porção C-terminal (TING; DAVIS 2005). O domínio N-terminal é responsável pelo recrutamento de adaptadores de sinalização a jusante com um domínio “Pyrin”, um domínio de recrutamento e ativação de caspase (CARD) (FRANCHI et al., 2009; KAWAI; AKIRA, 2011). O domínio NACHT envolve o recrutamento de pró-caspase 1 através da interação com uma proteína adaptadora contendo um domínio CARD (ASC), além de regular a auto-oligomerização de NLRs (RATHINAM, FITZGERALD, 2016). Por sua vez, o domínio LRR determina a especificidade dos ligandos, dependendo dos tipos de NLRs.

Deste modo, após interação com PAMPs ou DAMPs específicos, os NLR são oligomerizados em homo ou hetero-complexos para recrutar o pro-a caspase 1 (CASP1) através da proteína adaptadora ASC. O Pro-caspase 1 é subsequentemente ativado através da auto-clivagem para formar um complexo p10-p20 maduro. A caspase 1 ativa regula a geração de interleucina (IL) 1 β e IL18 maduras a partir de formas inativas para induzir a forma inflamatória de morte celular (piroptose) ou para recrutar outras células imunes (ZITVOGEL et al., 2012) (Figura 6).

2.3.1.1 Inflamassomas no câncer

Dentre todos os inflamassomas conhecidos, destacamos três pela participação na progressão, metástase e quimiorresistência do câncer a saber: NLRP3, NLRC4 e NLRP1 (ALLEN et al., 2010; WEI et al., 2013; FENG et al., 2017).

al., 2007). Consequentemente, ocorre aumento da expressão gênica de NLRP3 e IL-1 β por meio da sinalização de NF-kB (BAUERNFEIND et al., 2009) (Figura 7).

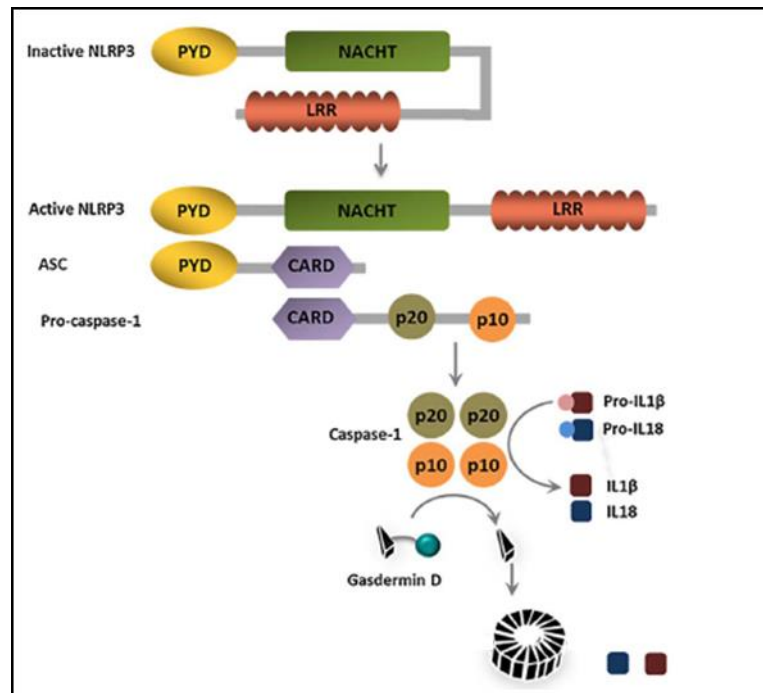


Figura 6: Esquema representando uma típica ativação de um NLRP. A Proteína NLRP3, a qual possui um domínio PYD, um domínio NACHT, e um motivo LRR. Para a funcionalidade do inflamassoma, a proteína NLRP3 interage com o domínio de pirina (PYD) de proteína semelhante associada à apoptose contendo um domínio recrutador de caspase (CARD) (ASC). O ASC associa-se com o NLRP3 através de interações no domínio PYD que trazem pro-caspase 1 no complexo através das interações do domínio CARD. A ativação da pro-caspase 1 leva à caspase 1 ativa (dímeros p20-p10 que em solução se associam aos tetrâmeros) que maturam IL1 β e IL18 levando à sua liberação por um mecanismo ainda desconhecido. A ativação da caspase 1 induz também a piroptose (morte celular por caspase) através da clivagem de Gasdermin D, uma proteína deformante da membrana que também leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias para o espaço extracelular. (Adaptado de AWAD et al., 2018).

2.3.1.1.1 Inflamassoma NLRP3

Um dos primeiros exemplos a serem usados para observar o evento de ativação do complexo NLRP3 foi a ligação do lipopolissacarídeo (LPS) ao TLR4. Com o avançar científico, demonstrou-se que outras moléculas também são capazes de ativar o complexo, como o ATP por meio da ligação ao receptor purinérgico P2X7 (HAAG et

Como um segundo sinal, os mecanismos de ativação do NLRP3 suportados pela maioria dos estudos literários incluem efluxo de potássio para fora da célula, geração de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (ROS), translocação de NLRP3 para a mitocôndria, liberação de DNA mitocondrial ou cardiolipina, e liberação de catesinas no citosol após a desestabilização lisossomal (LAMKANFI; DIXIT, 2014; SUTTERWALA et al., 2015).

Inflamassoma NLRP3 tem apresentado um efeito dual no câncer, promovendo ou inibindo a progressão tumoral dependendo do contexto (ZITVOGEL et al., 2012; BERRAONDO et al., 2016). Dados da literatura apontam que camundongos deficientes em NLRP3 e caspase 1 foram primeiramente considerados altamente suscetíveis à formação de tumores colorretais (ALLEN et al., 2010). Ainda o inflamassoma NLRP3 atua como um regulador negativo na carcinogênese colorretal induzida por produtos químicos (ALLEN et al., 2010). Outro grupo demonstrou que a deficiência de NLRP3 ou caspase 1 em camundongos, resulta na perda da integridade epitelial, aumentando a infiltração de leucócitos e a produção de quimiocinas no cólon, levando a maiores taxas de mortalidade. Assim, o inflamassoma NLRP3 é importante para a manutenção da homeostase intestinal e proteção contra doenças inflamatórias (ZAKI et al., 2010). Também parece apresentar um efeito protetor no câncer hepatocelular (WEI et al., 2014).

O Em contrapartida, o aumento do processamento de IL1 β pela superexpressão de NLRP3 em astrócitos humanos e astrogliomas conferiu-lhes um fenótipo mesenquimal, incluindo aumento da capacidade migratória, assinatura gênica única e sinalização pró-inflamatória (TARASSISHIN et al., 2014).

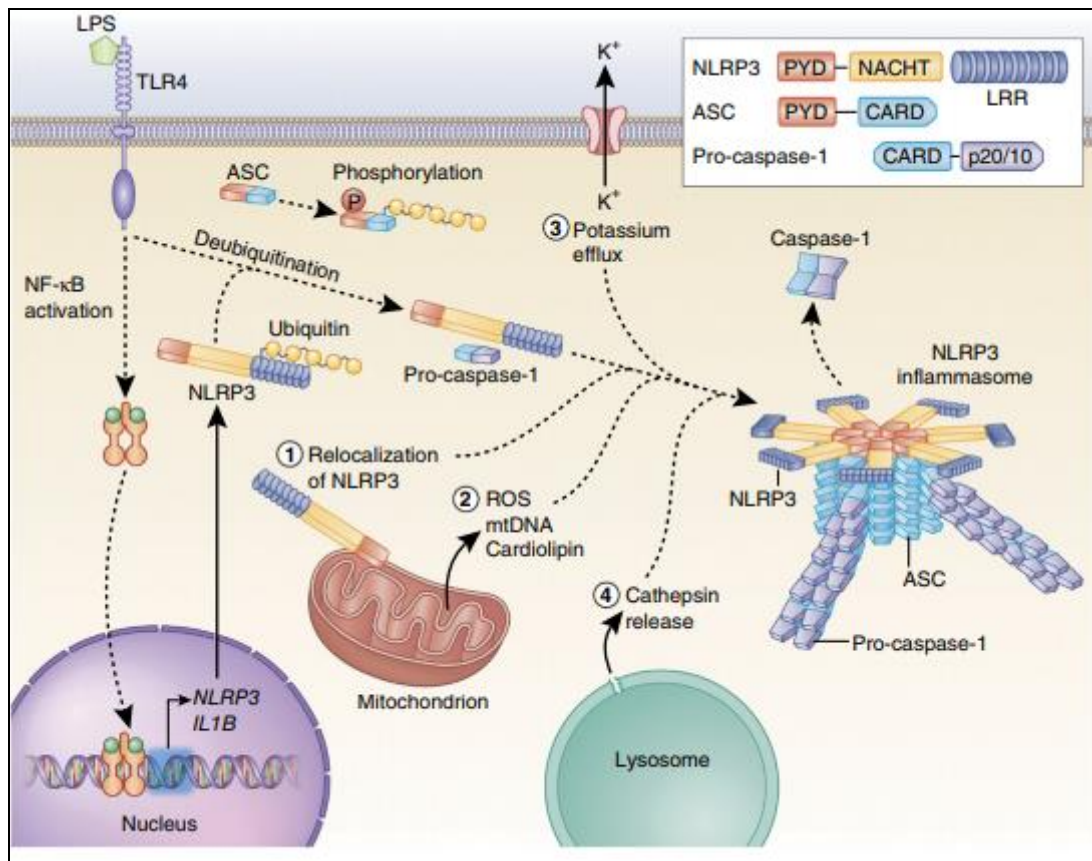


Figura 7: Ligantes que podem ativar o inflamassoma NLRP3. Sua ativação envolve dois passos distintos. Primeiro, um estímulo de ativação de NF-κB, como a ligação de LPS ao TLR4, induz expressão de NLRP3 (bem como IL1β), o que leva ao aumento da expressão da proteína NLRP3 (e IL1β inativa). Além disso, o priming imediatamente licencia o NLRP3 induzindo sua desubiquitinação. A proteína adaptadora ASC deve tornar-se linearmente ubiquitinada e fosforilada para ocorrer a montagem inflamassoma. Após o priming, a ativação do inflamassoma NLRP3 canônico requer um segundo sinal distinto para ativar o NLRP3 e levar à formação do complexo inflamassoma NLRP3. Os estímulos de ativação mais comumente aceitos para NLRP3 incluem realocização de NLRP3 na mitocôndria, a sensação de fatores mitocondriais liberados no citosol (ROS mitocondrial, DNA mitocondrial ou cardiolipina), efluxo de potássio através de canais iônicos e liberação de cathepsina após desestabilização de membranas lisossômicas. Os filamentos da pró-caspase 1 subsequentemente formam filamentos ASC através das interações CARD-CARD, permitindo a ativação autoproteolítica da pró-caspase 1. A inserção mostra o arranjo do domínio dos componentes do inflamassoma NLRP3. Os domínios pró-caspase 1 e caspase 1 são simplificados para clareza, o domínio CARD é realmente removido por clivagem e dois heterodímeros se formam com os domínios efetores p20 e p10 (p20 / 10) (GUO et al., 2015).

Adicionalmente, em carcinoma oral de células escamosas (OSCC) a superativação do NLRP3 provocou a progressão do câncer, enquanto que sua baixa expressão foi correlacionada a pequena agressividade tumoral. Ainda, os autores apontaram fortes evidências da participação do NLRP3 na aquisição da quimiorresistência do OSCC ao 5-Fluoracil (FENG et al., 2017). Ademais, dados do presente ano mostram ainda que a inflamação persistente sinalizadora de NLRP3 pode ser o estágio inicial da carcinogênese do câncer epitelial de ovário endometrióide (CHANG et al, 2018).

2.3.1.1.2 Inflamassoma NLRC4

Assim como o NLRP3, o inflamassoma NLRC4 é descrito apresentando tanto mecanismos protetores do câncer quanto carcinogênicos. Em câncer melanoma, o NLRC4, de maneira independente do inflamassoma, desempenha um papel essencial na supressão da progressão do tumor (JANOWSKI et al., 2016). Contudo, no câncer de mama associado a obesidade, Kolb e colaboradores (2016) observaram que a via de ativação do inflamassoma NLRC4 e a consequente ativação da IL1 β promoveu a progressão do câncer.

Em contraste aos diversos estímulos ativadores do inflamassoma NLRP3, para o NLRC4 eles são mais limitados, sendo ativados em resposta à infecção por *Salmonella* (MARIATHASAN et al., 2004), flagelina bacteriana (MIAO et al., 2006) e múltiplos componentes dos sistemas de secreção do tipo III bacteriano (MIAO et al., 2010). No entanto, o NLRC4 não interage diretamente com seus ativadores; em vez disso, uma família de proteínas, denominadas NAIPs (família NLR, proteínas inibitórias da apoptose), atuam como sensores que reconhecem o ligante e induzem a ativação do inflamassoma NLRC4 (LIGHTFIELD et al., 2011).

2.3.1.1.3 Inflamassoma NLRP1

A ativação do NLRP1, pode ocorrer pela presença do peptídeo muramil (MDP), fragmento do peptidoglicano de bactérias Gram-positivas e negativas e ATP (THI; HONG, 2017). MDP foi visto interagindo principalmente com NLRP1 humano, enquanto a toxina de *B. anthracis* foi observada em NLRP1b (murinos) (FAUSTIN et al., 2007).

O inflamassoma NLRP1 não precisa necessariamente de ASC, o que facilita a ativação direta da caspase-1 via interação CARD-CARD. Zhai e colaboradores (2017) sugeriram que o NLRP1 tem atividades biológicas adicionais além da maturação da IL1 β e investigou seu papel na tumorigênese do melanoma. A expressão de NLRP1 no melanoma foi confirmada pela análise de 216 tumores de melanoma e 13 linhagens celulares de melanoma humano. Ao contrário das células THP-1 monocíticas com localização nuclear proeminente, as células de melanoma expressaram NLRP1 principalmente no citoplasma.

Além dessas características, o NLRP1 também regula a ativação do NF- κ B, que confere resistência ao melanoma à apoptose (CAPORALI et al., 2012). Portanto, o NLRP1 não é apenas uma proteína antiapoptótica, mas também pode mediar a resistência a certos fármacos, como agentes que danificam o DNA.

Wei e colaboradores (2017), especulam que assim como o NLRP3, o NLRP1 seja ativado no microambiente tumoral por fator inflamatório, ATP endógeno, dano celular, ou efluxo de potássio (TANG et al., 2010; KANG et al., 2014; GUEY et al., 2014; WILLIAMS et al., 2015; ZHAI et al., 2017).

2.3.2 Moléculas e mecanismos que modulam a quimiorresistência e a influência do inflamassoma NLRP1

O inflamassoma NLRP1 tem sido associado ao processo anti-apoptótico contribuindo para a resistência a terapias. Tal função, sobrepõe ao inflamassoma uma importância direta no tratamento do câncer. Recentemente, a ativação do inflamassoma NLRP1, foi discutido como um evento supressor da via apoptótica mitocondrial promovendo a resistência à morte induzida por químicos no câncer de pele melanoma (ZHAI et al., 2017). Sua ativação também reduziu a atividade de caspase 2, caspase 9 e as caspases 3/7 resultando na diminuição da apoptose. Neste contexto, Zhai e colaboradores (2017) interpretaram que o NLRP1 não é apenas uma proteína antiapoptótica, mas também pode mediar a resistência a certos fármacos, como agentes que danificam o DNA (ZHAI et al., 2017).

A inibição da apoptose em resposta a drogas quimioterápicas é um dos principais eventos durante o desenvolvimento de quimiorresistência em células cancerosas. A

apoptose intrínseca é majoritariamente regulada pelas proteínas da família do linfoma-2 das células B (BCL-2). Tal fato, é atribuído principalmente ao padrão alterado de expressão de proteínas antiapoptóticas e proapoptóticas em células quimiorresistentes (Revisado por MAJI et al., 2018). As proteínas antiapoptóticas BCL-2 são freqüentemente reguladas positivamente, compensando a função das proteínas pró-apoptóticas nas células resistentes à quimioterápicos (REVISADO por MAJI et al., 2018).

No CEO, uma possibilidade baseada em dados da literatura aponta para a resistência à apoptose induzida por cisplatina mediada pela superexpressão da proteína BCL-2 (YANG et al., 2002; MURATA et al., 2004). Adicionalmente, em câncer gástrico, a expressão aumentada de BCL-2 também foi significativamente correlacionada com quimiorresistência ao 5-Fluorouracil (5-FU), adriamicina e mitomicina (GENG et al., 2013). Interessantemente, a família BCL-2 congrega membros pró-sobrevivência incluindo as isoformas BCL-2, BCL-XL e BCL-W, ao passo que os membros pró-apoptóticos compreendem grupos de múltiplos domínios (BAX e BAK, BID e outros). Dados da literatura apontaram que Knockdown de BCL-2 por RNA de interferência diminuiu a relação BCL-2 / BAX e induziu a apoptose em células de osteossarcoma e condrossarcoma humano resistentes à doxorubicina (KIM et al., 2009; ZHAO et al., 2009).

Além da subfamília BAX, a proteína p53, também tem uma função regulatória no processo apoptótico (Revisado por HEINTZ et al., 2017). A p53 é uma fosfoproteína tetramérica de 53kDa, codificada pelo gene *TP53*, supressor de tumor de suma importância no câncer humano (ÇALIK et al., 2015; Revisado por MEEK, 2015). Seu papel primário é reconhecer se o dano é irrevogável e, consequentemente, induzir a apoptose. A p53 se liga especificamente ao DNA e age como fator de transcrição (HAINAUT; HOLLSTEIN, 2000); contudo, ainda mais importantemente para as células cancerosas, atua como indutor de mecanismos de reparo ao DNA (YOGOSAWA; YOSHIDA, 2018). Para tornar os mecanismos de ação do *TP53* mais claros, quando funcional, a molécula ativa a proteína denominada “murine double minute 2” (MDM2). Essa é uma ubiquitina E3 ligase que atua como principal antagonista celular de p53 (MARINE; LOZANO, 2010). A interação entre p53 e

MDM2 é finamente controlada. A exemplo, Oliver e colaboradores (2011) descreveram caspases 2 e 3 como reguladoras importantes do processo referido, na ausência e na presença de dano ao DNA, respectivamente. Contudo, diversos outros fenômenos já foram relatados concernentes às alterações do gene *TP53* no câncer humano, sendo os mesmos desde mutações pontuais, até acúmulo de mutações na molécula e mesmo a aglomeração de estruturas do gene (Ó HAINMHIRE et al., 2014; GIACOMELLI et al., 2018). Em todo evento, o resultado é a perda de funcionalidade supressora de tumor e a observação do desenvolvimento e da progressão de malignidades (HAINAUT; HOLLSTEIN, 2000; HAVRILESKY et al., 2003; PETITJEAN et al., 2007).

As funções da p53 podem ser suprimidas em locais de inflamação. Numerosos estudos relataram que o fator nuclear do fator de transcrição - κ B (NF- κ B) é um regulador chave que liga infecções persistentes e inflamação crônica ao aumento do risco de câncer (TANIGUCHI; KARIN, 2018). De fato, o NF- κ B inibe a atividade transcricional da p53 (Revisado por UEHARA; TANAKA, 2018).

Além do mecanismo inibitório recíproco entre a inflamação mediada pelo p53 e pelo NF- κ B, estudos relataram o papel do p53 no microambiente inflamatório do tumor (GUDKOV; KOMAROVA, 2016; CORDANI et al., 2016). As citocinas / quimiocinas e patógenos presentes no microambiente inflamatório, contribuem para o aumento da inflamação principalmente em células cancerosas que abrigam mutação em p53 (GUDKOV; KOMAROVA, 2016), como é o caso de 98% dos COS-AG (DUCIE et al., 2017).

Neste contexto, o microambiente tumoral desempenha um papel essencial na mediação do crescimento, invasão e metástase de tumores malignos e, portanto, representa um alvo terapêutico atraente em tumores sólidos, incluindo o CEO (CHO et al., 2015). O microambiente tumoral consiste em vários tipos de células, incluindo fibroblastos, células imunes e células endoteliais, bem como componentes não celulares, como a matriz extracelular (MEC), enzimas de remodelação da MEC, (como as metaloproteinases de matriz (MMPs), inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e lisil oxidases (LOXs)), e fatores de crescimento (por exemplo, VEGF, TGF- β e PDGF) (CHO et al., 2015).

A MEC é construída a partir de secreções celulares e é um regulador crítico do desenvolvimento e função tecidual normal (MECHAM, 2014). Além do suporte físico, desempenha um papel único na homeostase dos tecidos (BONNANS et al., 2014) por meio de sua complexa organização, composição e remodelação contínua.

Os constituintes da MEC em diferentes tecidos variam, conferindo uma capacidade única de acomodar as necessidades específicas exigidas pelos diferentes tecidos (MOUW et al., 2014). Tal efeito é facilitado pelas interações químicas e físicas entre as células residentes e o microambiente em constante mudança (NABA et al., 2012).

A interação das células tumorais com MEC sustentando o microambiente tumoral tem forte contribuição na aquisição da resistência aos quimioterápicos. Neste contexto os inflamassomas são identificados como importantes agentes de contribuição direta na manutenção do microambiente pela ativação e secreção da IL1 β . Nossos resultados apontam interessantes correlações dos inflamassomas NLRP3 e NLRP1 como agente contribuinte para a sustentação da quimiorresistência da ACRP à cisplatina e promoção direta da mesma, respectivamente.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Dada a relevância clínica do subtipo COS-AG que congrega tumores agressivos por serem compostos, dentre outros aspectos, por células quimiorresistentes à cisplatina o presente estudo teve como objetivo central a análise da expressão de componentes do inflamassoma no fenômeno supracitado em linhagens celulares parental sensível à cisplatina, A2780, e com quimiorresistência adquirida, ACRP.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para contemplar o objetivo geral proposto, estabelecemos os objetivos específicos, a saber:

1. Estabelecimento da linhagem resistente à cisplatina, ACRP, a partir da linhagem parental sensível ao agente antineoplásico, representado pela A2780;
2. Avaliar a viabilidade celular metabólica das linhagens referidas antes após o tratamento das mesmas com concentrações crescentes de cisplatina pelo método do MTT, calculando a IC₅₀ da droga em cada linhagem celular em estudo;
3. Verificar a viabilidade celular em ambas as linhagens de interesse por meio do ensaio de formação de colônias;
4. Investigar a expressão dos transcritos que potencialmente contribuem para a quimiorresistência à cisplatina mediada por inflamassoma, tais como NLRP3, NLRC4, NLRP1, ASC, IL1R, IL1 β , bcl-2, NF-KB e Tp53;
5. Estudar a expressão proteica do inflamassoma NLRP3 e CASPASE 1;
6. Analisar a expressão dos transcritos NLRP3, IL1R e IL1 β após a formação de aglomerados celulares em modelo de cultura 3D.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS CELULARES, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR

Para a realização dos experimentos do presente projeto de pesquisa, utilizou-se as seguintes linhagens de câncer de ovário: A2780 e ACRP. Todas as linhagens foram mantidas em meio RPMI (Sigma, MO, EUA) suplementado com 0,2% (m/v) de bicarbonato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco/Invitrogen, NY, EUA), 1% (v/v) de solução estabilizada de penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco/Invitrogen, NY, EUA), em estufa com condições controladas de temperatura (37°C) e atmosfera de 5% de CO₂. A morfologia celular foi observada utilizando microscópio do tipo invertido para cultura de células, modelo Leica DMI1. As todas as imagens foram captadas por meio do conjunto de aplicativos “software” Leica (LAS, Leica Application Suite, Wetzlar, Alemanha).

4.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA E CÁLCULO DA IC₅₀ ESTIMADA

Brevemente, as células foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/poço e, após 24h de cultivo, foram tratadas com cisplatina (diluída em tampão PBS 1x) por 24h. Posteriormente, as células foram incubadas com 10 µL com MTT 5 mg/mL por 4h. As placas foram, então, centrifugadas a 450xg e acrescidas de 100 µL de dimetil sulfoxido P.A. (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan. Os ensaios foram resolvidos por meio da leitura das reações em comprimento de onda de 538 nm. Reações conduzidas somente na presença do tampão PBS 1x foram utilizadas como controle. O cálculo da IC₅₀ foi estimada pelo “software” GraphPadPrism versão 5.0.

O cálculo da concentração inibitória de 50% das (IC₅₀) células de interesse foi realizado utilizando o método de determinação da viabilidade celular metabólica (VCM) pelo do ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma, MO, EUA). Esse mensura o metabolismo celular por meio da redução do MTT pela succinato-desidrogenase mitocondrial a cristais de

formazan, cuja produção é proporcional ao número de células metabolicamente ativas.

4.3 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

Para avaliar a modulação quantitativa e qualitativa da formação de colônias pela cisplatina, A2780 e ACRP foram plaqueadas à densidade de 150 células/poço. Após 24h, as células foram tratadas com cisplatina em IC₇₅, IC₅₀, IC₂₅ por 24h. Então, as células foram lavadas com meio RPMI e, seguidos 8 dias de cultivo, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (p/v) e coradas com cristal violeta 1% (p/v). A aquisição das imagens das colônias foi realizada no Chemi-Doc® XRS System (Bio-Rad, CA, EUA).

4.4 REAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA DE REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA COM cDNA (qRT-PCR)

A extração de RNA foi realizada com Trizol® (Sigma, MO, EUA) de acordo com as especificações do fabricante, após tratamento de A2780 e ACRP com IC₇₅, IC₅₀ e IC₂₅ de cisplatina por 24h. O precipitado foi ressuspenso em 20µL de água DEPC (pirocarbonato de dietila) (Sigma, MO, EUA). O RNA foi quantificado utilizando espectrofotômetro Nanodrop-modelo ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Utilizou-se o kit SuperScript™ II RT (Bio-Rad, CA, EUA) para a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA 100µg/µL. O qRT-PCR foi realizado em termociclador ViiA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) com o sistema de detecção SYBR Green I (Ludwig Biotec, RS, Brasil). Os “primers” utilizados estão sumarizados na Tabela 1. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica, tendo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como gene de referência. A expressão relativa dos transcritos de interesse foi processada pelo método Ct (ΔC_t).

Tabela 1 – Sequências dos iniciadores (primers) utilizados no qRT-PCR

	Foward	Reverse
<i>NLRP3</i>	TCTCAGCAAATCAGGCTGGA	GTGGTCCATTCTGGTGGAGA
<i>NLRC4</i>	TAGCCGAGCCCTTATTCAA	ACCTTCTCGCAGCAAATGAT
<i>ASC</i>	GCCTGCACTTTATAGACCAGC	ACCTTCCCGTACAGAGCATC
<i>NLRP1</i>	CAGGCAGCACAGATCAACAT	GTGACCTTGAGGACGGAGAA
<i>BCL-2</i>	TGGAGAGAATGTTGGCGTCT	CCTCGCTGCACAAATACTCC
<i>TP53</i>	TGTCCTTCCTGGAGCGATCT	CAAACCCCTGGTTTAAGACTTC
<i>NF-κB</i>	GCATTCAGGTCGTAGTCCC	CTATACGTCAGCGCATCCAG
<i>IL-1β</i>	CAAAGGCGGCCAGGATATAA	CTAGGGATTGAGTCCACATTGAG
<i>IL-1R</i>	TAATGCTTTCCTCCCTGGCA	GATGACAGAAGAGCGGCATC
<i>GAPDH</i>	CAGCCTCAAGATCATCAGCA	ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT

4.5 IMMUNOBLOTTING

4.5.1 Preparo das amostras

A2780 e ACRP foram plaqueadas na densidade de $0,8 \times 10^6$ células/ML. Após 24h, as células foram tratadas com em concentrações de IC₇₅, IC₅₀ e IC₂₅ de cisplatina por 24h. Após 24h, as células foram lavadas com PBS e, posteriormente, feita a extração das proteínas utilizando o tampão de extração RIPA (tris-HCL pH 7.4 50 mM, cloreto de sódio 150mM, Triton 1% (v/v) 100X, deoxicolato de sódio 0,5% (p/v) e SDS 0,1% (v/v), acrescido de inibidores de fosfatases e proteases Roche's Complete™ (Sigma, MO, EUA). Os lisados celulares foram mantidos no gelo por 30 minutos, e, então, centrifugado por 15 minutos, a 4°C, a 9000xg.

As proteínas foram dosadas usando o Kit DC (BioRad DC™ Protein Assay, CA, EUA), seguindo instruções do fabricante. A curva padrão foi construída utilizando albumina sérica bovina (BSA) 0,2; 0,5; 0,7; 1; 1,5 e 2 µg/µL. A absorbância foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda a 650nm. Ainda, foi adicionado em cada amostra de β-mercaptoetanol 5% (v/v) e, posteriormente, desnaturadas a 95°C por 10 minutos.

4.5.2 Corrida Eletroforética

A técnica de SDS-PAGE (gel de poliacrilamida) foi utilizada separar as proteínas do lisado celular de acordo com o seu peso molecular. No gel SDS-PAGE 10% (p/v)

foram aplicados 25µg de proteína paralelamente a um padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ All Blue, 10-250kD) (Bio-Rad, CA, EUA) corrida eletroforética ocorreu progressivamente de 80 volts, para alinhamento das amostras, seguida de 120 volts para a separação efetiva das proteínas contidas em cada lisado celular.

4.5.3 Western-Blot

Após separadas, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de PVDF (Sequi-Blotim PDVF, 0,2pm) (Bio-Rad, CA, EUA) durante a noite, a 15 volts, em tampão de transferência composto por tris 0,3% (p/v), glicina 1,44% (p/v) e metanol 15% (v/v). A membrana foi lavada com água miliq por 5 minutos e, posteriormente, equilibrada com tampão TBS-T 1x (Composto por tampão TBS e Tween-20) por 5 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada por 1h em solução de bloqueio composta por BSA 5% (p/v) diluído em TBS-T 1x. A Tabela 2 compila os anticorpos utilizados em incubação de 1h para os ensaios de “blot”. Posteriormente, as membranas foram reveladas por quimioluminescência utilizando o kit ECL Super signal® West Dura (Bio-Rad, CA, EUA). As imagens foram adquiridas no Chemi-Doc® XRS System e analisadas utilizando o “software” ImageLab (Bio-Rad, CA, EUA).

Tabela 2: Lista dos anticorpos primários utilizados nos experimentos de “blot” para análise de expressão proteica.

Anticorpo	Fabricante	Diluição
<u>α-actina</u>	Sigma	1:1000
<u>Caspase 1</u>	<u>Abcam</u>	1:3000
NLRP3	<u>Abcam</u>	1:1000

4.6 CULTURA TRIDIMENSIONAL

Os ensaios de cultura 3D foram realizados no laboratório do professor Dr. Alexandre Bruni-Cardoso no Instituto de Química na Universidade de São Paulo (USP, SP).

4.6.1 Tratamento de placas de cultura de células com PolyHEMA e posterior ensaio com células dispostas em 3D

Placas de 6 poços (9 cm²) foram tratadas com polyHEMA (Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (Sigma-Aldrich, P3932) 120mg/ml e, após seladas, foram guardadas na geladeira até o uso. A2780 e ACRP foram plaqueadas em densidade de 5000 células/cm². Para a formação dos conglomerados celulares, o meio RPMI foi suplementado com matrigel 4% (p/v) (Corning® Matrigel® Matrix), a qual é rica em laminina-111 e colágeno IV. Experimentos controle na ausência de matrigel foram conduzidos em paralelo. As placas foram mantidas na estufa de cultura celular a 37°C e, após 4 dias, as células foram fotografadas e centrifugadas. O sobrenadante foi coletado para ensaio de ELISA e, das células, foi extraído o RNA para a realização do qRT-PCR como já descrito na sessão 4.5 deste manuscrito.

4.6.2 Tratamento de placas de cultura de células com matrigel e posterior ensaio com células dispostas 3D

Placas de 24 poços (2 cm²) foram tratadas com matrigel e colocadas na estufa de cultura celular por 20 minutos a 37°C. Posteriormente, A2780 e ACRP foram plaqueadas na densidade de 5000 células/cm². Para a formação dos aglomerados celulares, meio RPMI suplementado com matrigel 4% (p/v), sendo essa rica em laminina-111 e colágeno IV. As placas foram mantidas na estufa de cultura celular a 37°C e, após 4 dias, as células foram visualizadas e fotografadas, contudo, não foi possível coletá-las pois o meio da placa secou.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas para identificar diferenças significantes entre as linhagens A2780 e ACRP no teste de viabilidade celular metabólica por MTT, foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Adicionalmente, todos os resultados de qRT-PCR em cultura 2D foram realizados em triplicatas mecânicas e biológicas. Análises para identificar diferenças estatísticas entre dois grupos experimentais foram realizadas por meio de teste de Tukey não-pareado. Os testes estatísticos utilizados em cada um dos experimentos estão indicados nas legendas das figuras. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente

significante (** indica $P \leq 0,05$; *** indica $P \leq 0,001$). As análises foram realizadas no “software” GraphPadPrism v.5 para Windows (versão 5.00.288).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES EM CULTURA BIDIMENSIONAL

5.1.1 Estabelecimento da linhagem resistente: a ACRP é 5,265 mais resistente à cisplatina que a A2780

A linhagem ACRP foi inicialmente desenvolvida por Sherman-Baust e colaboradores (2003). Com fins ao resgate da resistência da ACRP à cisplatina, aplicamos concentrações (choques) crescentes entre 1 μM e 6 μM , duas vezes por semana do quimioterápico em questão. Além da resistência à cisplatina, a linhagem A2780 sofreu mudanças morfológicas marcantes, tal a alterar de fusiforme e levemente alongada ao formato estrelado, quando resistente ao quimioterápico utilizado (Figura 8). Alterações morfológicas em linhagem de resistência adquirida também foi observada por Guimarães (2018, tese não publicada) em linhagens de câncer de mama triplo negativo, MDA-MB-231 e na linhagem MCF-7, representativa de câncer de mama luminal A. Em ambos os modelos, foi observado aumento do volume celular e morfologia “achatada” (Guimarães, 2018). Além disso, em consonância às nossas observações, Guimarães (2018) notou que as linhagens resistentes cresciam lentamente quando comparadas às parentais que exibiam um perfil de crescimento rápido.

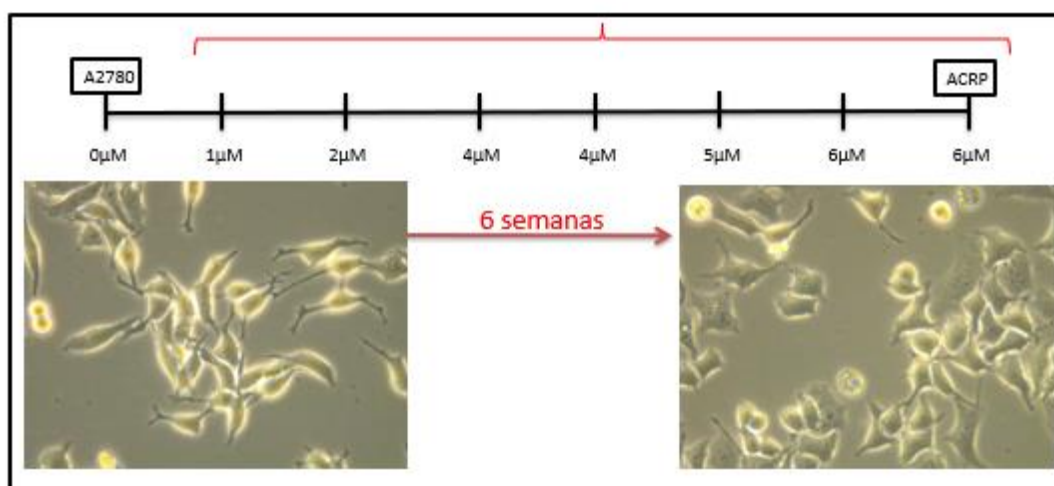


Figura 8: Estabelecimento da ACRP resistente à cisplatina. Esquema da geração da linhagem ACRP quimiorresistente à cisplatina, mimetizando o esquema terapêutico utilizado na clínica, circunstância em que as células tumorais das pacientes portadoras de CEO apresentam resistência adquirida à droga padrão-ouro, cisplatina. Note a resistência de ACRP à cisplatina, acompanhada por alteração morfológica da mesma. Conforme será mostrado a seguir, a IC_{50} estimado da A2780 e da ACRP frente ao tratamento com cisplatina. Cumpre relatar que a ACRP se mostrou 5,265 vezes mais resistente à cisplatina que a A2780 (IC_{50} 22,48 μ M vs. 4,27 μ M, respectivamente).

Conforme ilustrado na Figura 8, o protocolo adotado proporcionou o estabelecimento da linhagem ACRP resistente à cisplatina comparada às células parentais A2780, responsivas à cisplatina. Assim como realizado em nosso estudo, o desenvolvimento de linhagens resistentes tem sido amplamente utilizado para investigar mecanismos de citotoxicidade e resistência aos quimioterápicos (KARS et al., 2006; WIND; HOLEN, 2011; MCDERMOTT et al., 2014).

Diversos modelos foram propostos para o estabelecimento de linhagens tumorais resistentes aos quimioterápicos, dentre eles, se destacam os tratamentos intermitentes (choques) e tratamentos contínuos. O intermitente mimetiza os ciclos de quimioterapia permitindo que as células se recuperem em meio livre de droga após os choques do quimioterápico estabelecendo variantes com baixos índices de resistência (2 a 5 vezes) exibindo modestas alterações moleculares. Por outro lado, os tratamentos contínuos utilizam altas concentrações da droga e os clones selecionados desenvolvem na presença do fármaco, obtendo dessa forma modelos

de resistência mais estáveis e com intensas variações biológicas (MCDERMOTT et al., 2014).

De modo a comprovar a resistência à cisplatina na linhagem ACRP em detrimento à A2780, realizamos o ensaio de viabilidade celular metabólica pelo método de MTT como mostrado na figura 9. A ACRP mostrou-se estatisticamente mais resistente à cisplatina que a A2780 em quase todas as concentrações de cisplatina usadas. Tal resistência ainda pôde ser comprovada pela IC_{50} estimada em ambas as linhagens. A A2780 apresentou uma IC_{50} de aproximadamente 4,27 μM de cisplatina enquanto que para a ACRP a IC_{50} foi de 22,48 μM , configurando para a linhagem ACRP uma resistência de 5,265 vezes maior à cisplatina que a A2780. Nossos dados corroboram com os estudos de McDermott e colaboradores quando ao comparar linhagens obtidas de pacientes antes e pós quimioterapia, observaram que depois dos ciclos de tratamento a IC_{50} estavam em aproximadamente 2 a 5 vezes maiores que nas linhagens obtidas pré-quimioterapia.

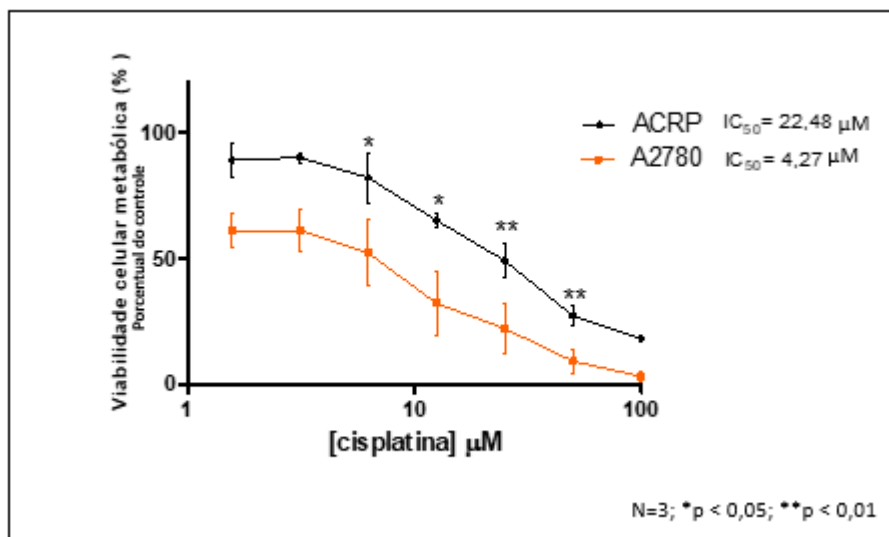


Figura 9: Viabilidade celular metabólica e IC_{50} estimada. O ensaio de viabilidade celular metabólica das linhagens A2780 e ACRP foi realizado após 24h de tratamento com cisplatina pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias com post test Bonferroni. Por sua vez, os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. N = 3. *p < 0,05; **p < 0,01.

Diante da confirmação da resistência à cisplatina na linhagem ACRP, analisamos a expressão de diversos RNA mensageiro (mRNA) que podem contribuir para o fenômeno da quimiorresistência adquirida à cisplatina na ACRP.

5.1.2 O inflamassoma NLRP3 parece contribuir apenas parcialmente para a aquisição do fenótipo quimiorresistente à cisplatina da ACRP

A literatura consta de publicações associando o inflamassoma NLRP3 a diversos cânceres, dentre eles câncer de estômago, de fígado e de próstata (XU et al., 2013; WEI et al., 2014; PANCHANATHAN et al., 2016). Sendo assim, motivamo-nos a proceder com experimentos de avaliação de expressão do transcrito e da proteína de NLRP3 em A2780 e ACRP. Interessantemente, enquanto os ensaios de q RT-PCR não demonstraram diferenças estatisticamente significativas na expressão de NLRP3 em ambas as linhagens celulares em relação ao controle não tratado (Figura 10), para o immunoblotting o quadro foi diferente (Figura 11). De fato, tal qual pode ser verificado na figura 11, a proteína NLRP3, principal componente do inflamassoma NLRP3, tende a apresentar maior expressão na ACRP que na A2780 quando submetidas à equivalentes condições de tratamento com as concentrações de IC50 e IC25. Entretanto, na ausência de droga e quando tratada com 10 µM de cisplatina, a ACRP tende a apresentar menor expressão de NLRP3 quando comparada a A2780.

Intrigantemente, cumpre ressaltar que, quando submetemos a linhagem resistente ao tratamento com cisplatina, a expressão do inflamassoma parece ser dose dependente, fato que não procede para a linhagem parental. Apesar de este experimento não ter sido realizado em triplicata, tal fato nos leva a supor que a participação desta proteína na resistência da ACRP não é totalmente excludente, contudo, não prefigura ser o evento principal.

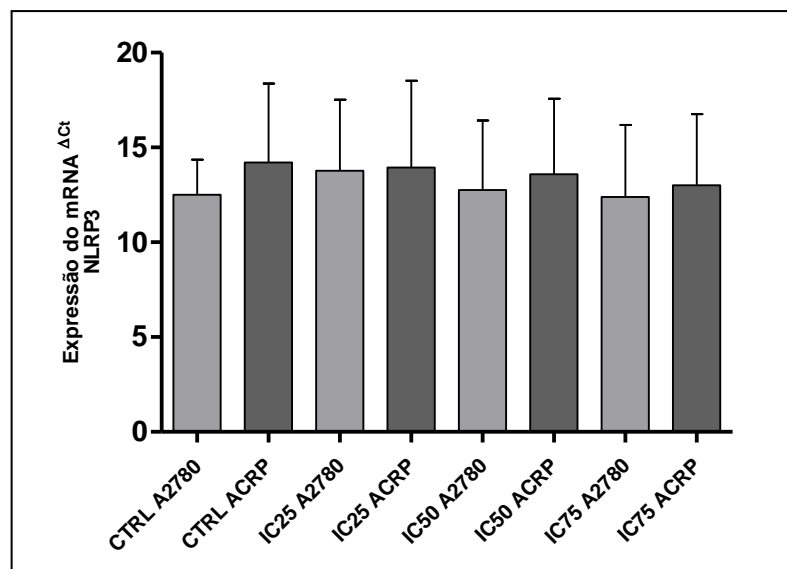


Figura 10: Expressão do transcrito NLRP3. As células A2780 e ACRP foram tratadas com diferentes concentrações de cisplatina: CTRL = 0 μ M; IC₂₅ A2780 = 2,14 μ M; IC₂₅ ACRP = 11,24 μ M; IC₅₀ A2780 = 4,27 μ M; IC₅₀ ACRP = 22,28 μ M; IC₇₅ A2780 = 6,41 μ M; IC₇₅ ACRP = 33,52 μ M. A expressão transcricional de interesse foi calculada pelo método de ΔC_t . A análise de variância unidirecional (ANOVA de uma via) foi realizada com pós-teste de Tukey, usando o GraphPadSoftware (GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA). Todas as análises foram feitas em triplicata mecânica e biológica.

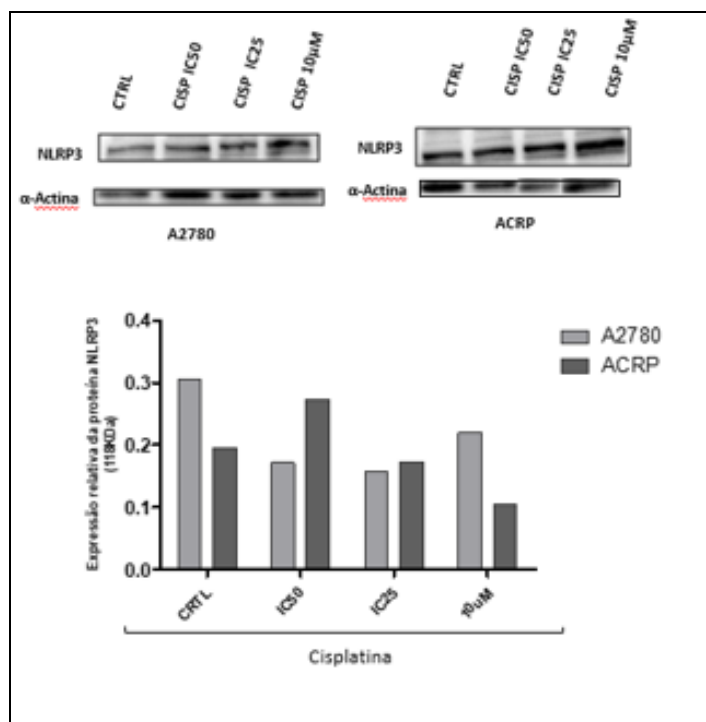


Figura 11: Expressão da proteína NLRP3 de 118KDa. As linhagens A2780 e ACRP foram submetidas a diferentes concentrações de cisplatina, a saber: CTRL A2780 e CTRL ACRP= 0 μ M; IC₅₀ A2780= 4,27 μ M; o IC₅₀ ACRP= 22,28 μ M; IC₂₅ A2780= 2,14 μ M; o IC₂₅ ACRP= 11,24 μ M; e 10 μ M em ambas linhagens. Para a análise da densitometria de bandas das amostras, foi utilizando o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado α -actina. n=1.

Como mencionado previamente, a função desse inflamassoma no câncer é complexo, apresentando um papel dual. Dados da literatura apontam que em carcinoma oral de células escamosas (OSCC) a alta expressão de NLRP3 está associada ao pior desfecho clínico em pacientes tratados com 5-Fluorouracil (5-FU) (FENG et al., 2017). Além disso, esses mesmos dados suportam a hipótese de que a ativação do inflamassoma NLRP3 age direcionando o desenvolvimento do câncer bem como contribuindo para resistência a quimioterapia baseada em 5-FU. Ainda, a baixa expressão do inflamassoma em questão, foi relacionada a um fenótipo menos agressivo de OSCC, e a diminuição da ativação do inflamassoma NLRP3 fortalece o efeito antitumoral do 5-FU nas células do OSCC (FENG et al., 2017).

Além dos efeitos pró-carcinogênicos, dados científicos também destacam o papel protetor desempenhado pelo inflamassoma NLRP3. Em ensaios *in vivo*, Chow e

colaboradores (2012) mostraram que camundongos do tipo selvagem têm taxas de formação de câncer maiores do que os camundongos cujo gene NLRP3 foi silenciado, demonstrando que o NLRP3 é um importante supressor da regulação da carcinogênese. Ressalta-se ainda que em carcinoma hepatocelular o inflamassoma NLRP3 também foi apresentado como supressor tumoral na carcinogênese em múltiplos estágios e sua desregulação foi importante para a progressão do tumor (WEI et al., 2013).

Cumprе salientar que, até o presente momento, não existe dados científicos consistentes que suportam a função e o papel de NLRP3 no CEO. Compilando os fatos supracitados, devemos investigar melhor o significado do aumento da expressão de NLRP3 em nossa linhagem para melhor entendimento do papel desempenhado dessa proteína na modulação do fenótipo resistente à cisplatina na linhagem ACRP que representa o COS-AG.

5.1.3 O transcrito ASC corrobora com a sugestão da ação de outros NLRPs na resistência adquirida pela ACRP

Dado que ASC é uma proteína adaptadora que possui o domínio CARD necessário para o recrutamento e ativação da caspase 1 no inflamassoma NLRP3 (FRANCHI et al., 2009), analisamos a expressão do seu transcrito nas linhagens de interesse. Conforme descrito na figura 12, o RNA mensageiro do gene ASC não apresentou diferença significativa em nenhum dos tratamentos usados (Figura 12). Contudo, cumpre salientar que a indiferente expressão constitutiva de ASC na linhagem ACRP nos permite inferir que existe a transcrição desse gene, porém essa não parece contribuir diretamente para o fenômeno de quimiorresistência adquirida pela ACRP. Tal hipótese surge embasada nos dados apresentados na figura 10, haja vista a relação existente entre essas duas moléculas, entretanto é preciso avaliar a expressão proteica afim de justificar nossa sugestão.

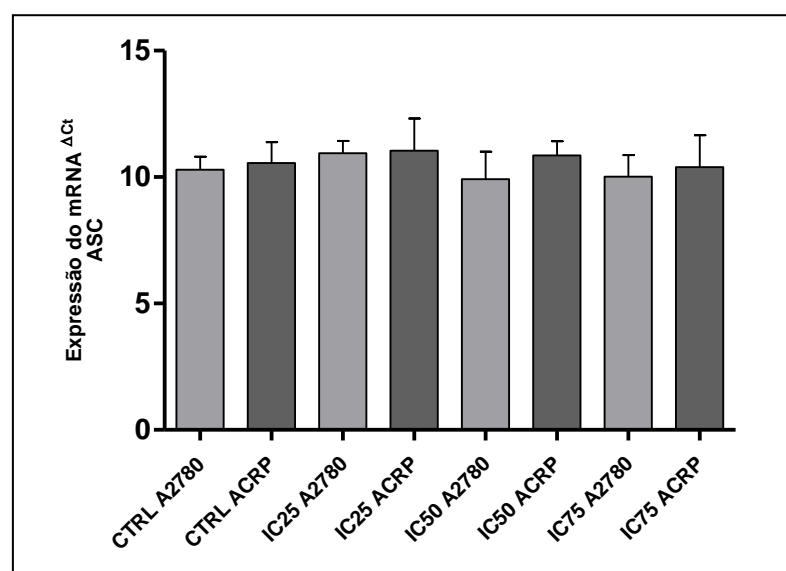


Figura 12: Expressão do RNA mensageiro do gene ASC. Foram utilizadas diferentes concentrações de cisplatina, onde: CTRL = 0 μ M; IC₂₅ A2780 = 2,14 μ M; IC₂₅ ACRP = 11,24 μ M; IC₅₀ A2780 = 4,27 μ M; IC₅₀ ACRP = 22,28 μ M; IC₇₅ A2780 = 6,41 μ M; IC₇₅ ACRP = 33,52 μ M. A expressão do transcrito alvo foi determinada por análise de ΔC_t . A análise de variância unidirecional (ANOVA de uma via) foi realizada com pós-teste de Tukey usando o GraphPadSoftware (GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA). N=3.

Até o presente momento, não existem trabalhos mostrando a participação de ASC na aquisição do fenótipo quimiorresistente, contudo, a literatura aponta que a baixa expressão de ASC está associada ao crescimento tumoral em células de melanoma metastático e que a alta expressão suprime o crescimento tumoral (LIU et al., 2013).

5.1.4 O inflamassoma NLRC4 também não se mostrou importante para a resistência da ACRP

Motivados à entender se algum NLR poderia influenciar diretamente no processo de aquisição da quimiorresistência à cisplatina na linhagem ACRP, analisamos a expressão do RNA mensageiro do NLRC4. O fato deste inflamassoma não necessariamente recrutar a proteína ASC para ativação da caspase 1 nos motivou (JANOWSKI et al, 2016). Além disso, a literatura mostra que o NLRC4 também desempenha importante papel no comportamento tumoral (JANOWSKI et al, 2016). Conforme os dados compilados na figura 13, as linhagens A2780 e ACRP não apresentaram diferença significativa na expressão do transcrito NLRC4 nas determinadas condições de tratamento. A expressão absoluta do transcrito de

NLRC4 manteve-se em aproximadamente 14, com uma pequena variação para baixo no IC₅₀ da A2780 (Figura 13).

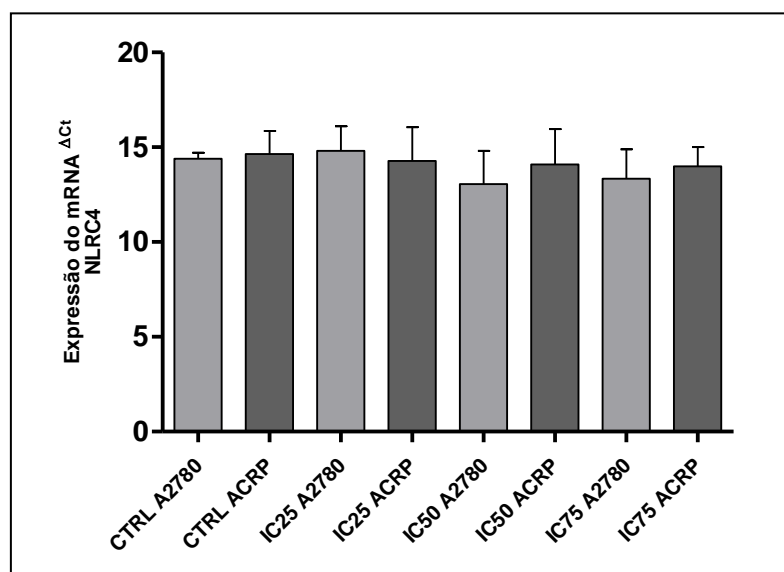


Figura 13: Expressão do transcrito NLRC4. As células foram tratadas com diferentes concentrações de cisplatina, onde: O CTRL = 0 μ M; IC₂₅ A2780 = 2,14 μ M; IC₂₅ ACRP = 11,24 μ M; IC₅₀ A2780 = 4,27 μ M; IC₅₀ ACRP = 22,28 μ M; IC₇₅ A2780 = 6,41 μ M; IC₇₅ ACRP = 33,52 μ M. A expressão do transcrito alvo foi determinada por análise de ΔC_t . A análise de variância unidirecional (ANOVA de uma via) foi realizada com pós-teste de Tukey usando o GraphPadSoftware (GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA). N=3.

Como já introduzido anteriormente, os tumores ovarianos resistentes aos quimioterápicos geralmente apresentam os piores prognósticos. Apesar dos nossos dados não terem apresentado diferença entre na linhagem resistente à cisplatina quando comparada à sensível, a literatura mostra o inflamassoma NLRC4 associado a um aumento da gravidade da tumorigênese colorretal induzida por azoximetano e sulfato de dextrano sódico (compostos químicos indutores de câncer) (ALLEN et al., 2010). Por outro lado, Hu e colaboradores (2011) observaram que camundongos deficientes em NLRC4 aumentaram significativamente o número de tumores e a carga tumoral de câncer de cólon em comparação aos normais. De acordo com essas afirmações, é possível destacar o papel dual do inflamassoma NLRC4 no câncer. Sobre a quimiorresistência, a literatura não consta de informações que relacionam o inflamassoma NLRC4 a ela. Consoante a isso, apesar dos nossos dados não indicarem um efeito direto do NLRC4 na aquisição da quimiorresistência

à cisplatina na ACRP, é necessário que outros experimentos sejam realizados justificando a consistência dessa nossa hipótese.

5.1.5 A supressão do inflamassoma NLRP1 sugere forte correlação deste inflamassoma com a resistência da ACRP à cisplatina

Após a análise do transcrito do NLRC4, analisamos a expressão do RNA mensageiro do inflamassoma NLRP1 (Figura 14), que assim como NLRC4, não necessita da proteína ASC para exercer sua função.

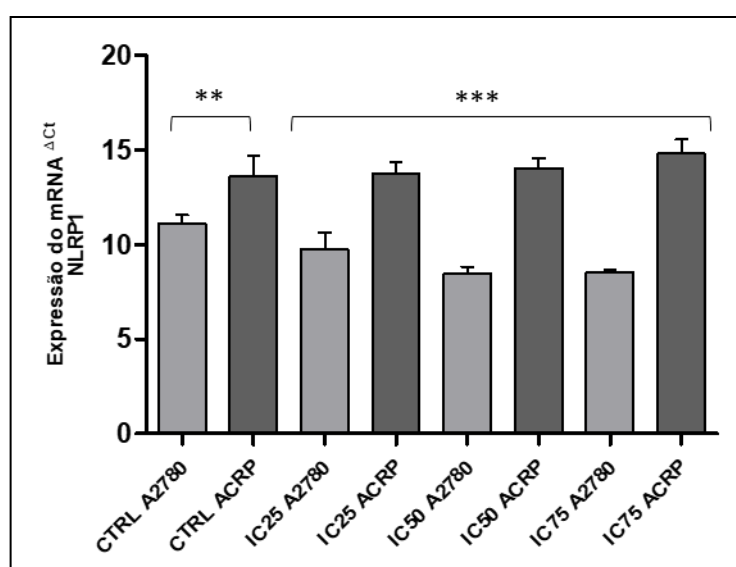


Figura 14: Expressão do RNA mensageiro do gene NLRP1. As células receberam tratamento em diferentes concentrações de cisplatina, onde: O CTRL = 0 μ M; IC₂₅ A2780 = 2,14 μ M; IC₂₅ ACRP = 11,24 μ M; IC₅₀ A2780 = 4,27 μ M; IC₅₀ ACRP = 22,28 μ M; IC₇₅ A2780 = 6,41 μ M; IC₇₅ ACRP = 33,52 μ M. A expressão do transcrito alvo foi determinada por análise de ΔC_t , na qual houve diferença significativa entre as linhagens A2780 e ACRP em todas as concentrações de cisplatina usadas. A análise de variância unidirecional (ANOVA de uma via) foi realizada com pós-teste de Tukey usando o GraphPadSoftware (GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA). O valor de $p < 0,0001$ (***) e $p < 0,05$ (**) foi considerado estatisticamente significativo. N=3.

Interessantemente, a expressão do transcrito do inflamassoma NLRP1 aumentou significativamente na linhagem resistente em comparação a linhagem parental, em todas as condições de tratamento com cisplatina (Figura 14). Conforme os dados compilados na figura 14, mesmo na condição sem tratamento, a expressão constitutiva do transcrito do NLRP1 mostrou-se maior na ACRP quando comparada

à linhagem sensível, apontando um $p < 0,05$. E essa expressão aumentou de forma dose dependente, à medida que a concentração de cisplatina também aumentava, aproximando-se a superioridade de 2 vezes maior na condição do IC₇₅ da linhagem resistente quando comparado a sensível.

Diante disso, nossos dados fornecem evidências de que o NLRP1, dentre todos os inflamassomas estudados, pode ter um papel ativo na aquisição do fenótipo quimiorresistente à cisplatina pela ACRP. Dados da literatura suportam nossa hipótese, quando em câncer melanoma a alta expressão de NLRP1 suprimiu a via apoptótica mitocondrial mediada por caspase 2/9 no melanoma metastático (ZHAI et al., 2017). Neste estudo, Zhai e colaboradores (2017) usaram indutores de apoptose que são intercaladores de DNA e conferem uma potente atividade antitumoral. Eles observaram efeitos mais robustos na inibição das caspases 2/9 quando tratadas com os inibidores da topoisomerase do DNA (ZHAI et al., 2017).

Assim como ocorre com a cisplatina, esses agentes danificadores do DNA que podem interferir nas topoisomerasas envolvidas na replicação e transcrição, ativam subsequentemente a via apoptótica mitocondrial mediada por p53, na qual as caspases 2 e 9 atuam como as principais caspases (BAPTISTE-OKOH et al., 2008; POMMIER et al., 2010).

Intrigados com este relato, analisamos a expressão dos transcritos bcl-2 e p53 afim de corroborar com nossos resultados acerca da contribuição singular do RNA mensageiro do NLRP1 na quimiorresistência da ACRP.

5.1.6 A expressão aumentada de bcl-2 na ACRP contribui para a influência do inflamassoma NLRP1 na quimiorresistência adquirida

Sabendo que a alta expressão do NLRP1 suprime a via apoptótica (ZHAI et al., 2017), analisamos a expressão do transcrito bcl-2, visto que através dele é traduzido uma das proteínas mais importantes que compõe o fenômeno anti-apoptótico. Como pode ser observado na figura 15 que, embora não estatisticamente significativa, a expressão de bcl-2 na ACRP tende a ser maior do que na linhagem parental A2780 para todas as concentrações de cisplatina utilizadas.

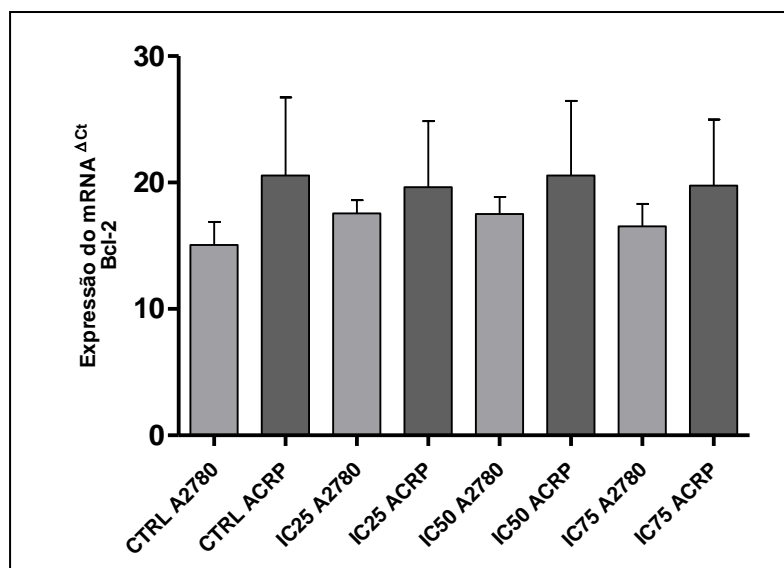


Figura 15: Expressão do transcrito bcl-2. As células foram tratadas em diferentes concentrações de cisplatina, onde: O CTRL = 0 μ M; IC₂₅ A2780 = 2,14 μ M; IC₂₅ ACRP = 11,24 μ M; IC₅₀ A2780 = 4,27 μ M; IC₅₀ ACRP = 22,28 μ M; IC₇₅ A2780 = 6,41 μ M; IC₇₅ ACRP = 33,52 μ M. A expressão do transcrito alvo foi determinada por análise de ΔC_t . A análise de variância unidirecional (ANOVA de uma via) foi realizada com pós-teste de Tukey usando o GraphPadSoftware (GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA). N=3.

Interessantemente, é possível notar que a expressão absoluta do transcrito bcl-2 se mantém constante na ACRP desde a condição não tratada até a maior concentração de cisplatina equivalente usada. Tal fato evidencia que os diferentes tratamentos com cisplatina nesta linhagem não altera seu perfil apoptótico. Contudo, o mesmo não ocorre para a A2780, visto que na situação sem tratamento a expressão do transcrito bcl-2 foi menor do que quando as células foram submetidas à cisplatina, informando que a cisplatina pode neste caso, estar modulando o perfil apoptótico da linhagem sensível (Figura 15).

Nossos dados corroboram com a literatura a qual afirma que além de potencialmente conduzir a progressão maligna em múltiplos passos, a expressão aumentada de bcl-2, bem como do gene bcl-xL, correlaciona-se fortemente com a resistência à maioria dos agentes quimioterápicos (SCHMITT et al., 2000; AMUNDSON et al., 2000).

Além disso, cumpre salientar que bcl-2 age promovendo a sobrevivência e inibindo a proliferação celular (JOHNSTONE et al., 2002) propondo o conceito de que o comprometimento da apoptose é um passo crítico no desenvolvimento tumoral (VAUX et al., 1988; STRASSER et al., 1990). Presumivelmente, a apoptose normalmente elimina a maioria das células cujo controle do ciclo celular é perturbado por mutações oncogênicas. Uma vez desordenada, a apoptose preserva não apenas as células pré-neoplásicas, como também aquelas portadoras de mutações permitindo a quebra de barreiras teciduais normais e facilitando a metástase (ADAMNS; CORY, 2007).

Com embasamento às literaturas supracitadas, torna-se importante o estudo relacionado à integralização da apoptose ao fenômeno de resistência aos agentes quimioterápicos. Tal justificativa, enobrece o presente trabalho de modo que foi observado um diferente delineamento do transcrito bcl-2 na linhagem resistente em relação à sensível, que em consonância aos dados compilados na figura 14, apontam forte correlação do bcl-2 com NLRP1 culminando na resistência adquirida da ACRP à cisplatina.

5.1.7 Os transcritos do Tp53 e NF-kB apotam pouca relação destes à aquisição da resistência à cisplatina pela ACRP

Diversos estudos têm mostrado a relação que existe entre as proteínas bcl-2 e p53 na regulação da apoptose (VASEVA; MOLL, 2009; CZABOTAR et al., 2014; KIM et al., 2014). Interessados em certificar se p53 contribui para a resistência adquirida pela ACRP, analisamos a expressão do transcrito da p53 (Figura 16).

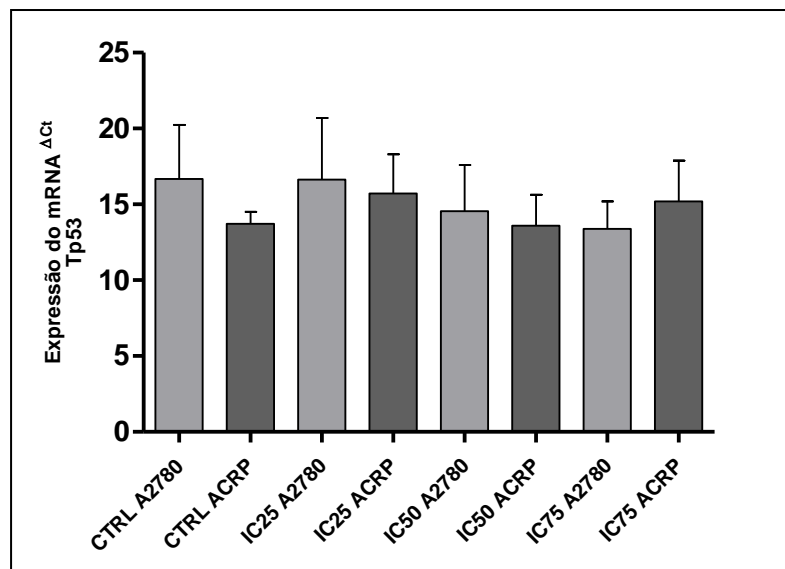


Figura 16: Expressão do RNA mensageiro de Tp53. As células foram tratadas em diferentes concentrações de cisplatina, onde: O CTRL = 0 μ M; IC₂₅ A2780 = 2,14 μ M; IC₂₅ ACRP = 11,24 μ M; IC₅₀ A2780 = 4,27 μ M; IC₅₀ ACRP = 22,28 μ M; IC₇₅ A2780 = 6,41 μ M; IC₇₅ ACRP = 33,52 μ M. A expressão do transcrito alvo foi determinada por análise de ΔC_t . A análise de variância unidirecional (ANOVA de uma via) foi realizada com pós-teste de Tukey usando o GraphPadSoftware (GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA). N=3.

De acordo com os dados observados na figura 16, não houve diferença no RNA mensageiro nas linhagens estudadas nas diferentes condições de tratamento. Tais dados corroboram com a literatura em que Pietro e colaboradores (2012) destacam que no câncer testicular humano a expressão relativa do mRNA de p53 também não apresentou diferença nas linhagens de resistência induzida. Além disso, a regulação negativa da proteína p53 com o siRNA diminuiu a apoptose induzida pela cisplatina em células de câncer de testículo tanto resistentes quanto sensíveis à cisplatina (PIETRO et al., 2012).

Como já mencionado na introdução, 90% dos CEO possuem mutação no gene Tp53. Sob essa perspectiva, Zhang e colaboradores (2014) investigaram a associação da mutação em TP53 com resistência a drogas. Nesse trabalho os autores avaliaram, por PCR em tempo real e análises de sequenciamento de DNA, 153 amostras tumorais obtidas de pacientes com câncer epitelial de ovário avançado que receberam quimioterapia neoadjuvante baseada em platina. Como resultado, a mutação em TP53 mostrou está associada com a indução de resistência à platina e

é um fator independente para menor sobrevida livre de doença (ZHANG et al., 2014).

Além disso, foi relatado que o mutante p53 prolonga a ativação do NF- κ B e promove inflamação crônica e câncer associado à inflamação (OUDIN et al., 2016). Dada essa conjuntura de associações, analisamos o transcrito NF- κ B (Figura 17).

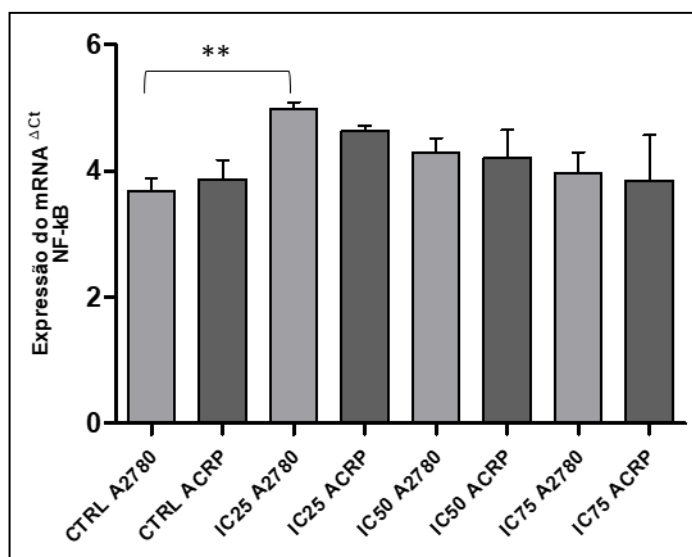


Figura 17: Expressão do RNA mensageiro do NF- κ B_{p65}. As células foram tratadas em diferentes concentrações de cisplatina, onde: O CTRL = 0 μ M; IC₂₅ A2780 = 2,14 μ M; IC₂₅ ACRP = 11,24 μ M; IC₅₀ A2780 = 4,27 μ M; IC₅₀ ACRP = 22,28 μ M; IC₇₅ A2780 = 6,41 μ M; IC₇₅ ACRP = 33,52 μ M. A expressão do transcrito alvo foi determinada por análise de ΔC_t , na qual houve diferença significativa somente entre os tratamentos da linhagem A2780 CTRL e IC25. A análise de variância unidirecional (ANOVA de uma via) foi realizada com pós-teste de Tukey usando o GraphPadSoftware (GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA). O valor de $p < 0,05$ (**) foi considerado estatisticamente significativo. N=3.

Conforme os dados compilados na figura 17, o NF- κ B não apresentou diferença significativa quando comparamos a A2780 e ACRP. É possível notar, entretanto, que independente da concentração usada, o perfil de expressão manteve-se equivalentes às duas linhagens, ou seja, quando a expressão aumentava/diminuia para a A2780 o mesmo ocorria na ACRP em todas as concentrações de cisplatina utilizadas (Figura 17).

Além disso, o NF- κ B parece deflagrar uma resposta inicial à cisplatina, tal qual pode ser observada após o tratamento na concentração da IC₂₅ equivalente. Essa concordância entre os resultados apontados para ambas as linhagens, nos leva a

sugerir que dado seu perfil de caráter inflamatório, o NF- κ B não necessariamente tenha ação quimiorresistente, mas é uma molécula importante no início do processo tanto para A2780 quanto para ACRP.

Dados da literatura apontam que a ativação do NF- κ B_{p52} ocorreu após o tratamento com o quimioterápico temozolomida em células M10 de câncer de pele melanoma. Essa ativação conferiu inibição do crescimento celular sugerindo que a combinação da temozolomida com inibidores do NF- κ B conferem benefícios clínicos para o tratamento do melanoma (CAPORALI., 2012).

Por outro lado, Rahnamoun e colaboradores (2017) perceberam que os mutantes p53 interagem diretamente com o fator de transcrição NF- κ B e ambos fatores impactam negativamente a ligação do outro em diversas ações dentro da célula.

Sobretudo, são necessários outros experimentos que confirmem a correlação do transcrito em questão e a quimiorresistência à cisplatina no COS-AG, visto que o NF- κ B também tem contribuído para a quimiorresistência no câncer melanoma por regulação do inflamassoma NLRP1 (ZHAI et al., 2017).

5.1.8 O transcrito da IL1 β intracelular não apontou diferença entre as linhagens estudadas

Ainda cumpre relatar que a atividade inflamatória desencadeada pelo NF- κ B, pode advir pela ligação da IL-1 β a seu receptor IL1R (Xia et al., 2014). Por conseguinte, analisamos a expressão do transcrito da IL-1 β e do seu receptor IL-1R nas linhagens A2780 e ACRP. Contudo, ambos os transcritos não revelaram diferença significativa de expressão nas linhagens conforme apontado nas figuras 18 e 19.

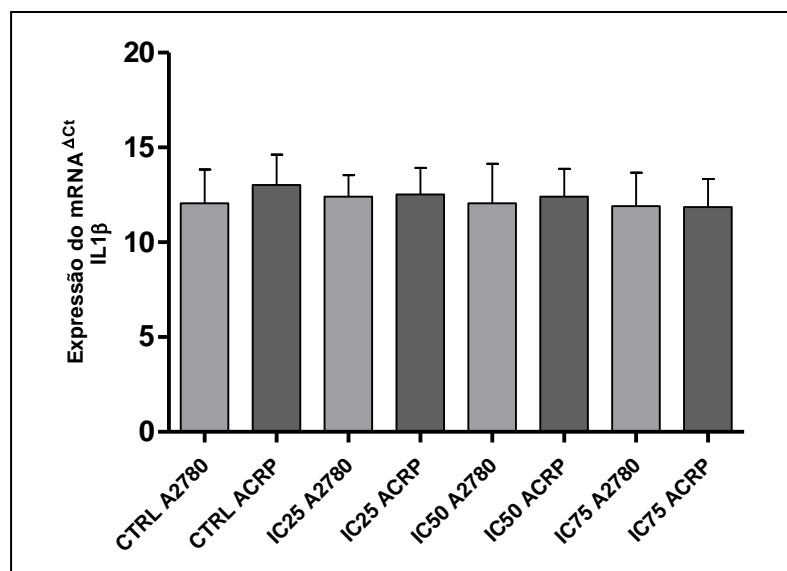


Figura 18: Expressão do RNA mensageiro da IL1 β . Foram aplicadas diferentes concentrações de cisplatina, onde: O CTRL = 0 μ M; IC₂₅ A2780 = 2,14 μ M; IC₂₅ ACRP = 11,24 μ M; IC₅₀ A2780 = 4,27 μ M; IC₅₀ ACRP = 22,28 μ M; IC₇₅ A2780 = 6,41 μ M; IC₇₅ ACRP = 33,52 μ M. A expressão do transcrito alvo foi determinada por análise de ΔC_t . A análise de variância unidirecional (ANOVA de uma via) foi realizada com pós-teste de Tukey usando o GraphPadSoftware (GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA). N=3.

Entretanto, a literatura mostra que na linhagem representativa do câncer de mama Luminal A, MCF-7, a estimulação com IL1 β conferiu resistência ao tratamento com doxorrubicina (MENDOZA-RODRÍGUEZ et al., 2017). Assim, apesar dos nossos resultados à cerca do transcrito da IL1 β , apontarem uma baixa ou nenhuma relação com a resistência à cisplatina, cumpre salientar que a IL1 β é ativada e secretada para o meio extracelular por meio da caspase 1, contribuindo para a manutenção do microambiente tumoral (DAVIS et. al, 2011).

Diante disso, é crucial a análise da proteína IL1 β no sobrenadante das células ainda que a resposta inflamatória não possa ser extrapolada apenas a partir de estudos *in vitro*.

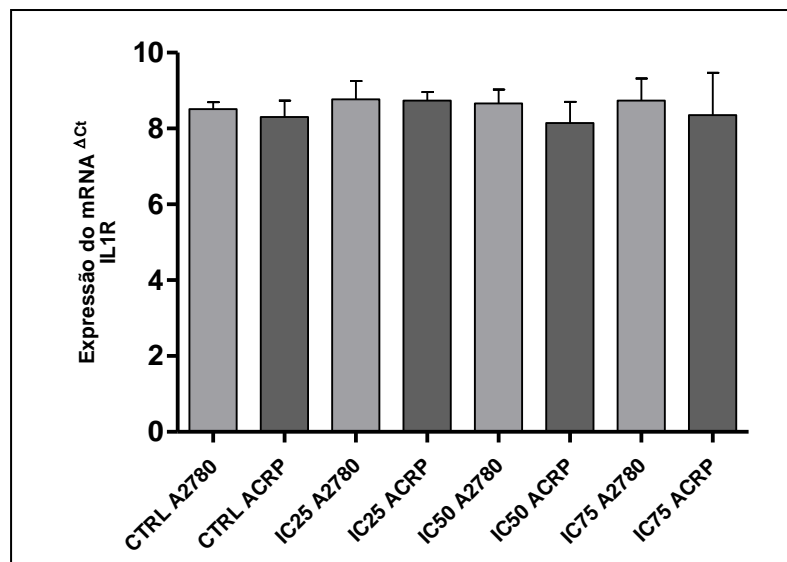


Figura 19: Expressão do RNA mensageiro do IL1R. Foram aplicadas diferentes concentrações de cisplatina, onde: O CTRL = 0 μ M; IC₂₅ A2780 = 2,14 μ M; IC₂₅ ACRP = 11,24 μ M; IC₅₀ A2780 = 4,27 μ M; IC₅₀ ACRP = 22,28 μ M; IC₇₅ A2780 = 6,41 μ M; IC₇₅ ACRP = 33,52 μ M. A expressão do transcrito alvo foi determinada por análise de ΔC_t . A análise de variância unidirecional (ANOVA de uma via) foi realizada com pós-teste de Tukey usando o GraphPadSoftware (GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA). N=3.

Adicionalmente, estudos de análises imuno-histoquímicas em tumores de pacientes com CO, revelaram não haver associação significativa entre o tipo histológico e o nível de expressão de IL1 β . Contudo, a taxa de expressão de IL1 β é maior nos tumores claros e mucinosos quando comparado aos tumores serosos e endometrioides. Ainda, a análise de sobrevida global revelou que 29% das pacientes cujos tumores expressaram IL1 β vieram a óbito da doença dentro de um período de 5 anos. Os autores deste estudo ainda ressaltaram que a IL1 β pode estar associada a tumores de um fenótipo mais agressivo, e a interferência em sua produção ou ação pode ser um alvo promissor para a terapia do carcinoma ovariano (WATANABE et al., 2012).

5.1.9 A expressão proteica da caspase 1 ativada aponta para a atuação dos inflamassomas na resistência adquirida da ACRP à cisplatina

Partindo da asserção literária onde a caspase 1 é descrita como necessária para a ativação e secreção da IL1 β , analisamos a proteína caspase 1. A figura 20 mostra que a caspase 1 inativa é naturalmente mais expressa na A2780 que na ACRP.

Contudo, para a confirmação deste dado são necessários outros experimentos, visto que o gene de referência indefine tal observação. Por outro lado, na concentração de cisplatina no IC₅₀ equivalente para cada linhagem, a ACRP aponta uma tendência ao aumento. Todavia, esse aumento se torna comprometido a medida que a concentração de cisplatina para essa linhagem diminui.

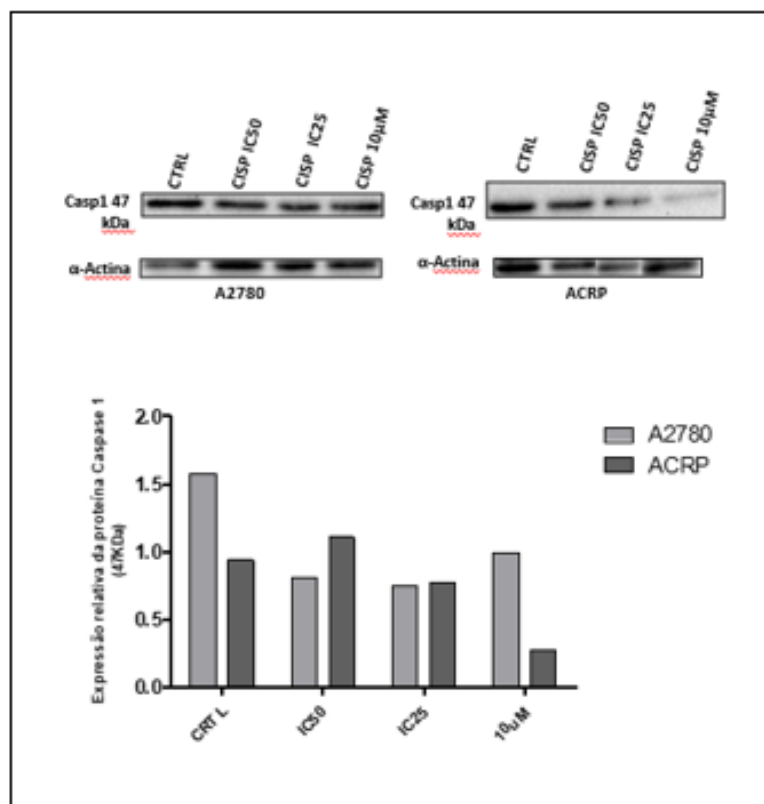


Figura 20: Expressão da proteína caspase 1 menos ativada de peso molecular de 47KDa. As linhagens A2780 e ACRP foram submetidas a diferentes concentrações de cisplatina, a saber: CTRL A2780 e CTRL ACRP= 0 µM; IC₅₀ A2780= 4,27 µM; o IC₅₀ ACRP= 22,28 µM; IC₂₅ A2780= 2,14 µM; o IC₂₅ ACRP= 11,24 µM; e 10µM em ambas linhagens. Para a análise da densitometria de bandas das amostras, foi utilizado o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado α-actina. N=1.

Conforme os dados compilados na figura 21, a expressão proteica na ACRP foi ainda menor que na inativada. Contudo, diferentemente do observado na figura anterior, a medida que a concentração de cisplatina diminuiu, aumentou a expressão da proteína no estado ativado de forma dose dependente. Quando ambas as linhagens foram submetidas a mesma concentração de cisplatina, de 10 µM, observa-se uma inversão na expressão proteica da caspase 1 ativada na ACRP. A este efeito concerne uma importante observação, pois é possível preconizar que

nesta concentração específica, o inflamassoma NLRP1 pode estar sendo ativado no citoplasma da célula, promovendo a clivagem da caspase 1 e consequentemente passagem do estado inativo para o ativado.

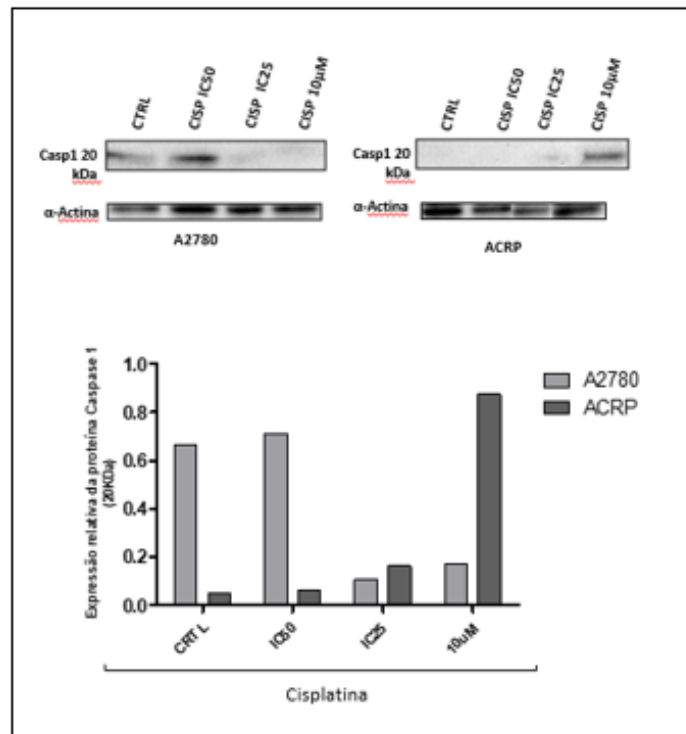


Figura 21: Expressão da proteína caspase 1 mais ativada de peso molecular de 20KDa. As linhagens A2780 e ACRP foram submetidas a diferentes concentrações de cisplatina, a saber: CTRL A2780 e CTRL ACRP= 0 μ M; IC₅₀ A2780= 4,27 μ M; o IC₅₀ ACRP= 22,28 μ M; IC₂₅ A2780= 2,14 μ M; o IC₂₅ ACRP= 11,24 μ M; e 10 μ M em ambas linhagens. Para a análise da densitometria de bandas das amostras, foi utilizado o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado α -actina. N=1.

Dados da literatura apontaram que *knockdown* de NLRP1 suprimiu significativamente a clivagem de caspase-1 e consequente atividade em células de melanoma metastático (1205Lu e HS294T), sugerindo que o inflamassoma NLRP1 participaram ativamente da clivagem da caspase-1. (ZHAI et al., 2017).

Embora nossos dados necessitem de melhores esclarecimentos, não é precoce dizer que o tratamento proporciona diferentes respostas da caspase 1 nas linhagens. Além disso, com base na literatura e nos dados apresentados neste presente estudo, sugerimos a ativação do inflamassoma NLRP1 como um

colaborador em potencial para a aquisição do fenótipo quimiorresistente da ACRP. Contudo, é imprescindível dizer que para efetivação da hipótese outrora discutida, outros experimentos são necessários.

5.1.10 A linhagem sensível a cisplatina formou colônias maiores e em maior número na condição sem tratamento

O ensaio de formação de colônias é um ensaio de sobrevivência celular *in vitro* tendo como base a capacidade de uma única célula crescer em uma colônia. O ensaio ainda avalia a capacidade de cada célula dentro de uma população sofrer divisão ilimitada (FRANKEN et al., 2006).

Apesar da interessante informação proporcionada pelo ensaio de formação de colônias, nosso experimento não foi esclarecedor visto que a concentração de cisplatina usada foi incompatível ao reduzido número de células como pode ser observado na figura 22.

Dessa forma, realizaremos outros ensaios usando concentrações mais baixas de cisplatina, afim de averiguar a capacidade de ambas as linhagens formarem colônias.

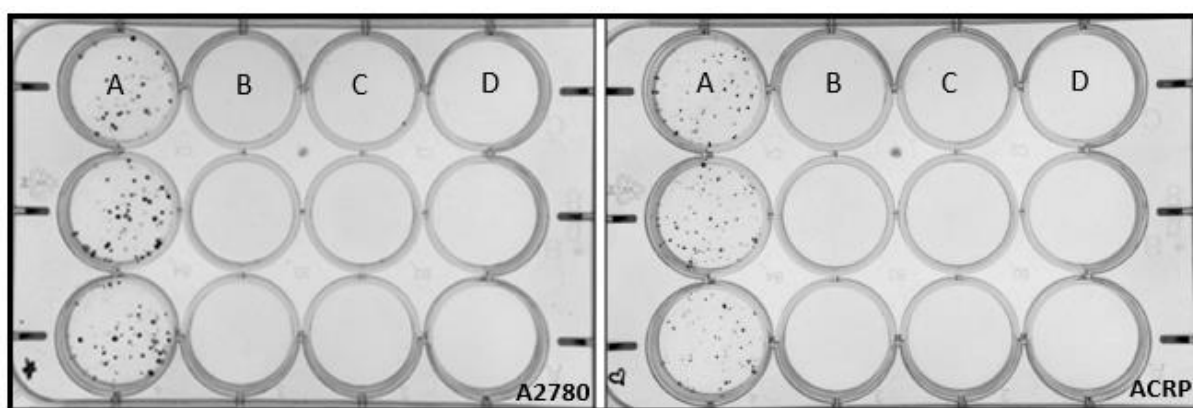


Figura 22: Ensaio de formação de colônias. O (A) CTRL A2780 e CTRL ACRP= 0 μM ; (B) IC_{25} A2780= 2,14 μM ; o IC_{25} ACRP= 11,24 μM ; o (C) IC_{50} A2780= 4,27 μM ; o IC_{50} ACRP= 22,28 μM ; o (D) IC_{75} A2780= 6,41 μM ; o IC_{75} ACRP= 33,52 μM . N=6.

5.2 ANÁLISES EM CULTURA TRIDIMENSIONAL

Compreendendo que a cultura 2D não considera adequadamente o ambiente 3D natural das células, inserimos as linhagens celulares estudadas na cultura tridimensional. Em ambos os métodos estudados, a formação dos clusters varia entre a A2780 e a ACRP. Na presença da matriz extracelular (Figura 23), a A2780 formou clusters maiores e pouco definidos quando comparado à ACRP. No entanto, falhas no método empregado impossibilitaram o prosseguimento das análises.

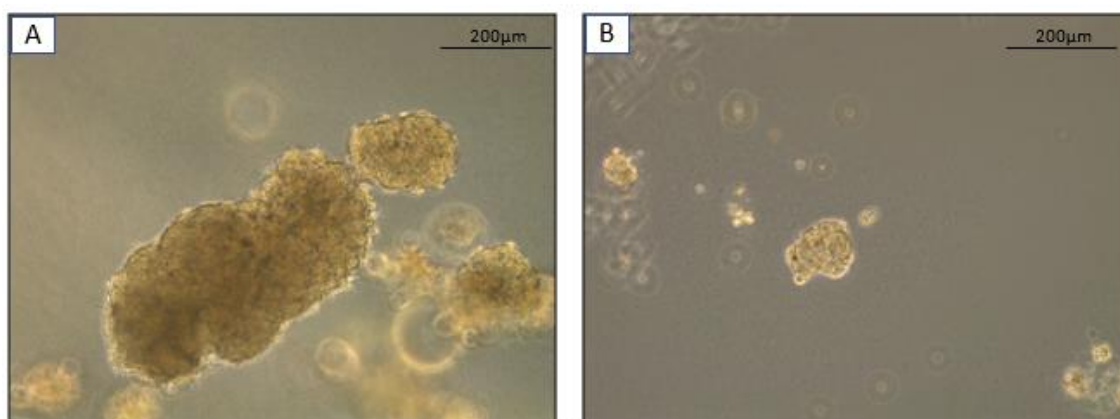


Figura 23: Cultura 3D OnTop. Aglomerados da cultura tridimensional OnTop das linhagens A2780 (A) e ACRP (B) no aumento de 10X. N=1.

Nos experimentos 3D, com as placas revestidas com polyHEMA, a linhagem ACRP formou clusters maiores que a A2780, entretanto, esta última, parece formar esferas com características de transição epitélio-mesenquimal (TEM) (Figura 24). Um estudo genético conduzido por Marchini e colaboradores (2013) analisou 23 biópsias de tumores de grau III e IV. Nesta análise, eles identificaram diversos genes envolvidos na TEM após o tratamento com platina. Assim, é necessário estudos que comprovem nossa observação de TEM na A2780.

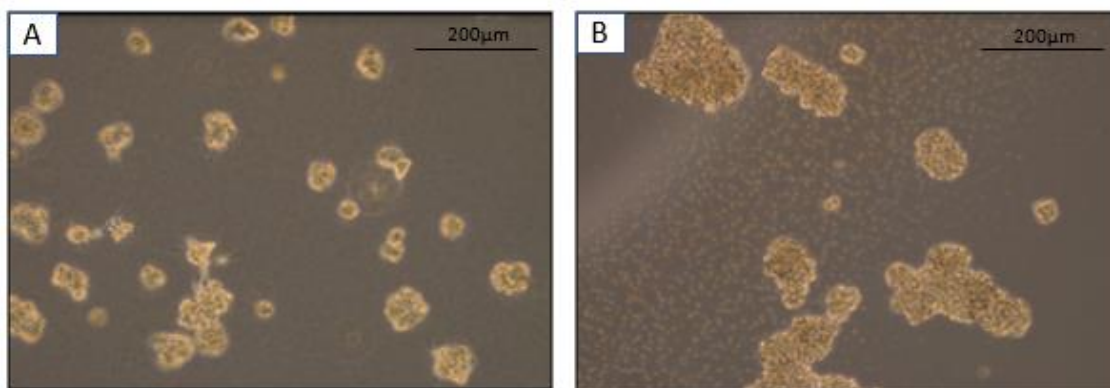


Figura 24: Cultura 3D em polyHEMA. Aglomerados da cultura tridimensional em polyHEMA das linhagens A2780 (A) e ACRP (B) no aumento de 10X. N=1.

A partir da cultura 3D em polyHEMA, analisamos a expressão dos transcritos, NLRP3, IL1R e IL1 β . Em consonância com a cultura em monocamada, a presença da matriz extracelular não provocou diferenças significativas na expressão dos transcritos analisados nas linhagens A2780 e ACRP (Figuras 25, 26 e 27).

Contudo, para IL1R e IL1 β na linhagem ACRP parece apresentar uma menor expressão constitutiva quando comparada a A2780. Porém, cumpre relatar que para os genes IL1R e IL1 β , a expressão dos respectivos transcritos foi maior na cultura 3D que na 2D, apontando assim que o ambiente tridimensional tem influência na expressão do RNA mensageiro dessas moléculas. Contudo, para justificar a expressão aumentada dos transcritos, IL1R e IL1 β , na cultura 3D, é necessário a análise da proteína IL1 β no sobrenadante das células.

Dados da literatura mostram que ao invés do colágeno IV presente do matrigel usado, o colágeno VI apresentou influência significativa na aquisição do fenótipo quimiorresistente da A2780 (SHERMAN-BAUST et al., 2003). Ainda, cumpre salientar, que mais experimentos necessitam ser realizados afim de elucidar os resultados encontrados.

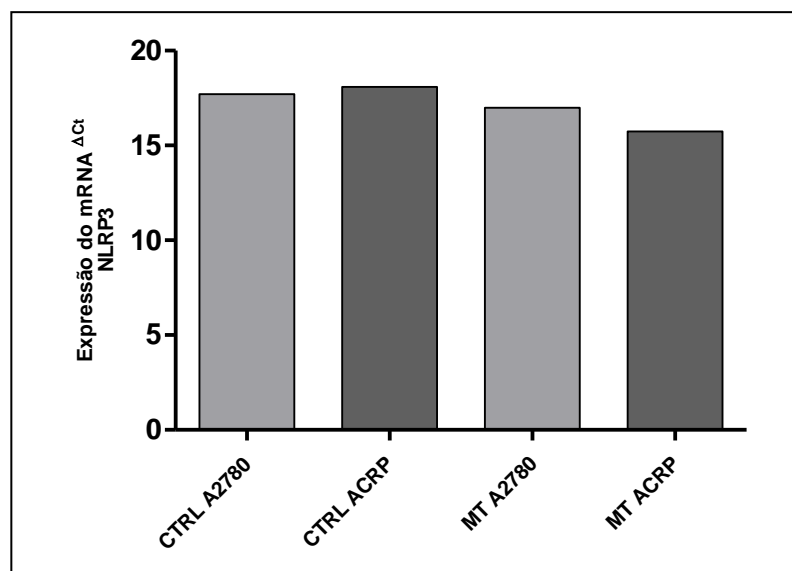


Figura 25: Expressão do RNA mensageiro do gene NLRP3 na cultura 3D. O CTRL representa as linhagens na ausência do matrigel e a sigla MT, na presença do mesmo. Neste trabalho foi usado o matrigel composto por colágeno IV e laminina-111. As análises foram realizadas usando o ΔC_t com N=1.

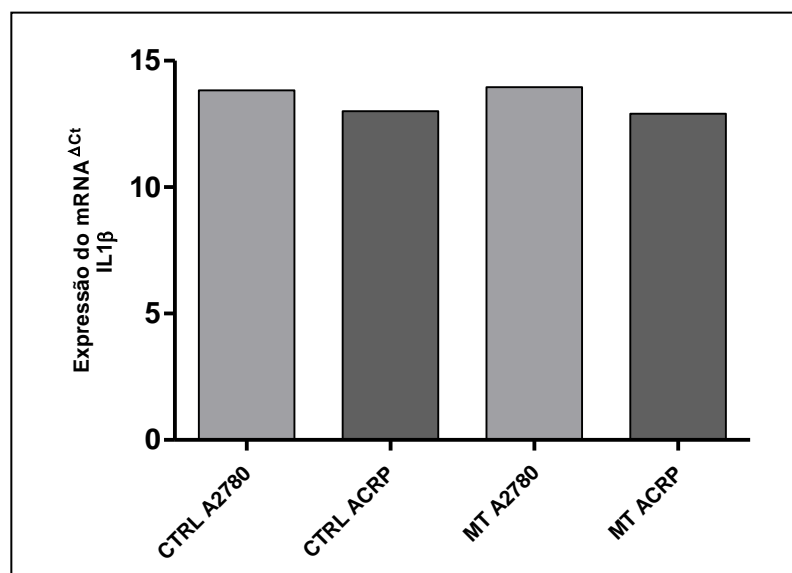


Figura 26: Expressão do RNA mensageiro do gene IL-1 β na cultura 3D. O CTRL representa as linhagens na ausência do matrigel e a sigla MT, na presença do mesmo. Neste trabalho foi usado o matrigel composto por colágeno IV e laminina-111. As análises foram realizadas usando o ΔC_t com N=1.

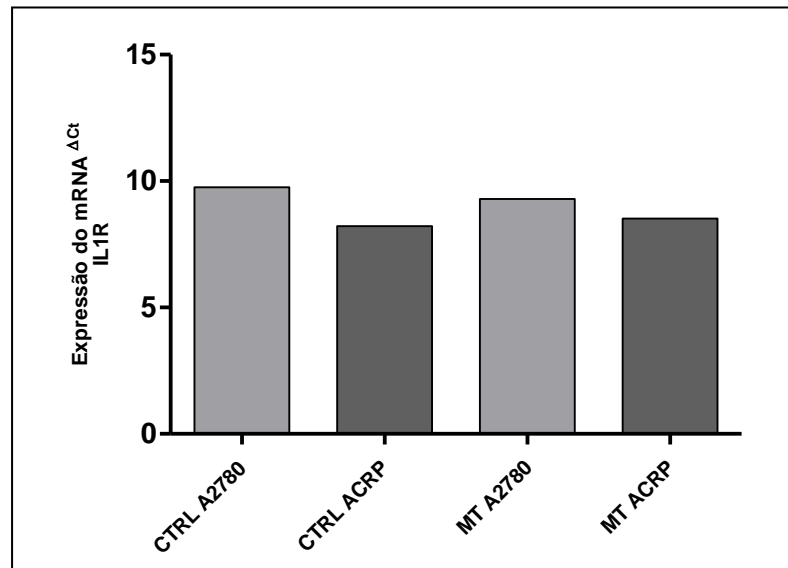


Figura 27: Expressão do RNA mensageiro do gene IL1R na cultura 3D. O CTRL representa as linhagens na ausência do matrigel e a sigla MT, na presença do mesmo. Neste trabalho foi usado o matrigel composto por colágeno IV e laminina-111. As análises foram realizadas usando o ΔC_t com N=1.

Embora nossos dados não tenham sido significativos, Sherman-Baust e colaboradores (2003) mostraram que a matriz extracelular (MEC) e mais especificamente a remodelação da MEC por meio do aumento da expressão do colágeno VI pelas células tumorais, podem contribuir para a resistência às drogas. Eles ainda ressaltam que a resistência aumentada à droga proporcionada pela MEC remodelada pode desempenhar um papel importante no fracasso da terapia do câncer.

Ademais, dados recentes mostraram que o colágeno-I pode promover a produção de IL-1 β independentemente do inflamassoma NLRP3 (POUDEL; GURUNG, 2018).

Assim, diante dos trabalhos acima mencionados, outros experimentos são necessários para melhor entendimento sobre a influência que a MEC exerce na modulação dos genes relacionados aos inflamassomas nas linhagens A2780 e ACRP.

Ainda é relevante evidenciar que as próprias células tumorais podem desempenhar um papel ativo na remodelação de seu microambiente, a fim de maximizar sua sobrevivência na presença de agentes citotóxicos (SHERMAN-BAUST et al., 2003). Ademais, Sherman-Baust e colaboradores (2003) ainda ressaltam que, em tais

circunstâncias, os tumores que expressam proteínas da ECM, como o seroso de alto grau, representado em seu estudo pela A2780 e ACRP, podem ter a capacidade de formar metástases distantes resistentes a medicamentos, aproveitando as interações de células tumorais com a ECM.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os dados compilados no presente estudo, a expressão pouco expressiva do transcrito NLRC4 sugere que este inflamassoma não apresenta relação com a quimiorresistência à cisplatina na linhagem estudada. O mesmo foi observado para o transcrito ASC e NLRP3. Entretanto o tratamento com cisplatina parece modular de forma dose-dependente a expressão proteica de NLRP3 na linhagem resistente. Assim, o NLRP3 parece desempenhar um papel na manutenção da quimiorresistência adquirida à cisplatina na linhagem ACRP, não configurando ser este o inflamassoma a desempenhar o evento principal. Por outro lado, o inflamassoma NLRP1 mostrou-se com superexpressão absoluta estatisticamente significativa na linhagem ACRP em detrimento à A2780. Apesar de termos estudado apenas o RNA mensageiro, tal fato nos permite sugerir que o inflamassoma em questão, participa ativamente da quimiorresistência à cisplatina adquirida pela ACRP. Essa hipótese se justifica com a expressão aumentada do transcrito de bcl-2. Baseando-se na literatura, é possível que o inflamassoma NLRP1 e a proteína bcl-2, tenham ações que promovam a resistência à cisplatina e sobrevivência das células ACRP resistentes. Contudo são necessários outros experimentos que ratifiquem nossa hipótese.

Embora o transcrito da IL1 β , bem como do seu receptor, não tenham mostrado expressão relevante, tanto no ensaio em 2D quanto no 3D, a expressão proteica da caspase 1 ativada quando tratada com 10 μ M de cisplatina na ACRP, aponta para a consequente ativação e secreção da IL1 β . Diante disso, cumpre salientar, que é necessário outras análises, como a dosagem da proteína no sobrenadante das células, que comprovem a função ativada da caspase 1, oriunda da ativação de inflamassomas, como contribuinte da resistência à cisplatina adquirida pela ACRP.

O transcrito do NF-kB aponta para uma importância significativa na fase inicial da quimiorresistência à cisplatina, visto que somente a A2780 demonstrou um aumento significativo quando tratada com uma pequena concentração da droga. Por outro lado, o transcrito Tp53, não parece desempenhar relevância na quimiorresistência à cisplatina em nenhuma das concentrações usadas.

Apesar da significativa contribuição da MEC, nossos dados não demonstraram diferença na expressão dos transcritos NLRP3, IL1 β e IL1R na presença da mesma.

Com base nos resultados obtidos no nosso estudo, foi possível a geração de um modelo conforme ilustrado na figura 28. O NLRP1 demonstra ser o principal inflamassoma, dentre os estudados, na aquisição do fenótipo quimiorresistente da ACRP à cisplatina. Além disso, a ativação da caspase 1 e a possível ativação e secreção da IL1 β pode promover a retroalimentação positiva de todo o sistema (Figura 28). Em consonância a este evento, o transcrito bcl-2, parece também contribuir para o fenômeno da quimiorresistência promovendo a sobrevivência das células.

Em suma, cumpre salientar, que nosso trabalho foi o primeiro a relatar o envolvimento do inflamassoma NLRP1 na quimiorresistência adquirida em células representativas do COS-AG, que segue desafiando clínicos e pesquisadores.

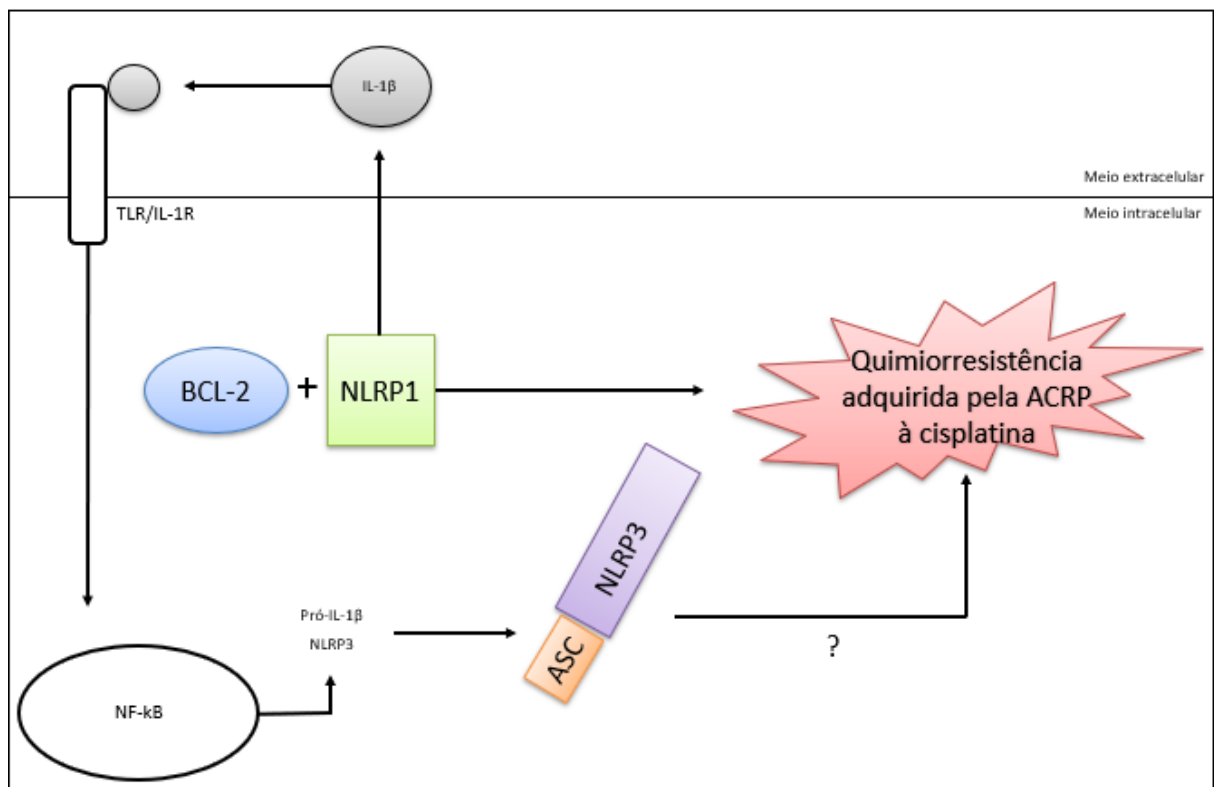


Figura 28: Modelo gerado a partir dos nossos resultados. O inflamassoma NLRP1 em conjunto à proteína bcl-2 promovem a quimiorresistência à cisplatina e sobrevivência das células resistentes. A ativação da caspase 1 e posterior ativação e secreção da IL1β estabelece uma retroalimentação positiva por meio de receptores IL1R e TLR, sustentando o fenômeno por meio da ativação do inflamassoma NLRP3, via NF-kB.

7 PERSPECTIVAS

Dada a relevância clínica do presente estudo, nosso grupo pretende prosseguir com as investigações do papel do inflamassoma principalmente nos tumores quimiorresistentes, conforme descrito a seguir:

- 1- Concluir as réplicas dos experimentos com apenas N=1, principalmente afim de verificar o papel do inflamassoma NLRP3;
- 2- Analisar a expressão do transcrito da caspase 1 por meio de RT-PCR;
- 3- Analisar a expressão proteica de NLRP1 e bcl-2 por Imunnobloting;
- 4- Analisar a expressão proteica da IL1 β no sobrenadante das linhagens de COS-AG, além de expandir o painel de citocinas pró-inflamatórias analisadas;
- 5- Realizar o ensaio de formação de colônias com concentrações mais baixas de cisplatina;
- 6- Avaliar o potencial metastático da A2780 e da ACRP, por meio do ensaio de migração;
- 7- Se comprovada a importância do gene NLRP1 na quimiorresistência adquirida pela ACRP à cisplatina, pretendemos silenciar o gene NLRP1 através no RNA de interferência com intuito de verificar se a resistência da ACRP será revertida.

8 REFERÊNCIAS

ADAMS, J.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, 26(9), 1324–1337, 2012.

ADAMS J; CORY S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, 26(9), 1324–1337, 2007.

ALGECIRAS-SCHIMNICH, A. Ovarian Cancer. **Clinical Laboratory News**, v.39, n. 3, 2013.

ALLEN, IC.; et al. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. **J Exp Med**. 207:1045–1056, 2010.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts and Figures 2018. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-036845.pdf>>. Acesso em: 20 de Agosto de 2018.

AMUNDSON, SA.; et al. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. **Cancer Res**. 60:6101–6110, 2000.

ARAVANTINOS, G.; PECTASIDES, D. Bevacizumab in combination with chemotherapy for the treatment of advanced ovarian cancer: a systematic review. **J Ovarian Res**. 03. 19;7:57, 2014.

BACHVAROV, D.; et al. Gene expression patterns, of chemoresistant an chemosensitive serous epithelial ovarian umors whih possible predictive value in response to initial chemotherapy. **Int J Oncol**, v. 29, n.4, p. 919-933, 2006.

BAPTISTE-OKOH, N.; et al. A role for caspase 2 and PIDD in the process of p53-mediated apoptosis. **Proc Natl Acad Sci USA**. 105: 1937–1942, 2008.

BARRENA MEDEL, NI.; et al. Targeted therapies in epithelial ovarian cancer. **J. Oncol**, p.314-326, 2010.

BAST, R.; et al. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 6, p. 1–28, 2009.

BASU, A.; KRISHNAMURTHY S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. **J Nucleic Acids**. pii: 201367, 2010.

BAUERNFEIND, FG.; et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **J. Immunol**. 183, 787–791, 2009.

BERRAONDO, P.; et al. Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. **Immunol Rev**. 274:290–306, 2016.

BISACCHI, D.; et al. Anti-angiogenesis and angioprevention: Mechanisms, problems and perspectives. **Cancer Detection and Prevention**, v. 27, n. 3, p. 229–238, 2003.

BLANKENSTEIN, T. The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 2, p. 180–186, 2005.

BONNANS, C.; et al. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 15(12):786–801, 2014.

BOOKMAN, MA.; et al. Evaluation of new platinumbased treatment regimens in advanced-stage ovarian cancer: a phase III trial of the gynecologic cancer intergroup. **J Clin Oncol**. 27:1419-25, 2009.

BORLEY, J.; et al. Does tumour biology determine surgical success in the treatment of epithelial ovarian cancer? A systematic literature review. **Br J Cancer**. 107:1069–1074, 2012.

BRADDOCK M, QUINN A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. **Nat Rev Drug Discov**. (4):330–9, 2003.

BRUCHIM, I. et al. Analysis of two topotecan treatment schedules in patients with recurrent ovarian cancer. **Journal of Chemotherapy**, 28(2), 129–134, 2016.

CAPORALI, S. et al. NF- κ B is activated in response to temozolomide in an AKT-dependent manner and confers protection against the growth suppressive effect of the drug. *J Transl Med.* 10: 252, 2012.

CHANG, CM. et al. Integrating the dysregulated inflammasome-based molecular functionome in the malignant transformation of endometriosis-associated ovarian carcinoma. **Oncotarget.** 9(3):3704-3726, 2018.

CHAVARRÍA-SMITH, J.; et al. The NLRP1 inflammasomes. **Immunological Reviews. California.** v. 265, p. 22–34, 2015.

CHO, JA.; et al. Exosomes from ovarian cancer cells induce adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to acquire the physical and functional characteristics of tumor-supporting myofibroblasts. **Gynecol Oncol.** 123:379-386, 2011.

CHO, A.; et al. The Extracellular Matrix in Epithelial Ovarian Cancer – A Piece of a Puzzle. **Frontiers in Oncology.**5:245, 2015.

CHOUBEY, D. Absent in melanoma 2 proteins in the development of cancer. **Cell Mol Life Sci.** 73:4383–4395, 2016.

CHOW, MT.; et al. NLRP3 suppresses NK cell-mediated responses to carcinogen-induced tumors and metastases. **Cancer Res.** 72(22):5721–32, 2012.

CHUNG, STM.; et al. “Osteoprotegerin mediates tumor-promoting effects of Interleukin-1 β in breast cancer cells” **Molecular cancer vol.** 16,1 27, 2017.

CLENDENEN, TV.; et al. Circulating inflammation markers and risk of epithelial ovarian cancer. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.** 20:799–810, 2011.

COLOMBO, N.; et al. Bevacizumab in ovarian cancer: Focus on clinical data and future perspectives. **Crit Rev Oncol Hematol.** 97:335-48, 2016.

CORY, S.; ADAMS, JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat Rev Cancer.** 2:647–656, 2002.

CORDANI, M.; et al. Mutant p53 proteins alter cancer cell secretome and tumour microenvironment: Involvement in cancer invasion and metastasis. **Cancer Lett.** 376:303–309, 2016.

CZABOTAR, PE.; et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nat Rev Mol Cell Biol**;15:49–63, 2014.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol.** 740:364-378, 2014.

DAVIS, BK.; et al. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and Associated Diseases. **Annu Rev. Immunol**, v. 29, p. 707–735, 2011.

DEL, B.; et al. Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. **Faseb J.** 11:947–953, 1997.

DELLA, PC.; et al. Low Grade Serous Ovarian Carcinoma: from the molecular characterization to the best therapeutic strategy. **Cancer Treat Rev.** 41(2):136-143, 2015.

DESAI, A.; et al. Epithelial ovarian cancer: An overview. **World journal of translational medicine.** 3(1):1-8, 2014.

DUCIE, J.; et al. Molecular analysis of high-grade serous ovarian carcinoma with and without associated serous tubal intra-epithelial carcinoma. **Nat Commun.** 17;8(1):990, 2017.

ELARAJ, DM.; et al. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 1088–1096, 2006.

ESQUIVEL-VELÁZQUEZ, M.; et al. The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 35, n. 1, p. 1–16, 2015.

FAUSTIN, B.; et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. **Molecular Cell.** California. v. 25, p. 713–724, 2007.

FENG, X.; et al. The role of NLRP3 inflammasome in 5-fluorouracil resistance of oral squamous cell carcinoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR.** 36:81, 2017.

FRANCHI, L.; et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. **Nat Immunol.** 10:241–7, 2007.

FRANCHI, L.; et al. “The Inflammasome: A Caspase-1 Activation Platform Regulating Immune Responses and Disease Pathogenesis.” **Nature immunology** 10.3. 241, 2009.

FRANKEN, NAP.; et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v.1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

GAO, F.; et al. Role of inflammation-associated microenvironment in tumorigenesis and metastasis. **Curr Cancer Drug Targets.** 14:30–45, 2014.

GIACOMELLI, AO.; et al. Mutational processes shape the landscape of TP53 mutations in human cancer. **Nat Genet.** 2018.

GONZALEZ-GUGEL, E.; et al. Modulation of innate immunity in the tumor microenvironment. **Cancer Immunol Immunother.** 65(10):1261-8, 2016.

GORE, M.; et al. Clinical evidence for topotecanpaclitaxel non-cross-resistance in ovarian cancer. **J Clin Oncol.** 19(7):1893-900, 2001.

GOTTESMAN, MM. Mechanisms of cancer drug resistance. **Annu Rev Med** 53: 615–627, 2002.

GUDKOV, AV.; KOMAROVA, EA. p53 and the Carcinogenicity of Chronic Inflammation. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.** 6, 2016.

GUEY, B.; et al. “Caspase-1 autoproteolysis is differentially required for NLRP1b and NLRP3 inflammasome function.” **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 111, no. 48, pp. 17254–17259, 2014.

GUO, H.; et al. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nature Medicine**. V. 21. p. 677–687, 2015.

HAAG, F.; et al. Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. **Purinergic signal.**, Dordrecht, v. 3, n. 1-2, p. 71-81, 2007.

HAGIOPAN, GS.; et al. Expression of p53 in cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines: modulation with the novel platinum analogue (1R,2R-diaminocyclohexane) (trans-diacetato)(dichloro)-platinum(IV). **Clin. Cancer Res.**, **5**: 655-663, 1999.

HAINAUT, P.; HOLLSTEIN M. p53 and human cancer: the first thousand mutations. **Adv Cancer Res** 77: 81-137, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the nex generation. **Cell**. 144:646–674, 2011.

HAVRILESKY, L.; et al. Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. **J Clin Oncol**. 21(20):3814-25, 2003.

HOLOHAN, C.; et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nat Rev Cancer**. 13: 714–726, 2013.

HU, B.; et al. Inflammasome-mediated suppression of inflammation-induced colorectal cancer progression is mediated by direct regulation of epithelial cell proliferation. **Cell Cycle**. 10(12):1936–9, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCa). Estimativas 2018: incidência de câncer no Brasil, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acesso em Abril de 2018.

ISABELA DOS SANTOS GUIMARÃES (GUIMARÃES). Estudo da eficácia e dos mecanismos celulares de esquemas terapêuticos contendo metformina contra o câncer de mama triplo-negativo. Tese de doutorado defendida em 2018. Disponível em: <http://www.bioteecnologia.ufes.br/pt-br/defesa-de-tese-isabella-Guimar%C3%A3es>. Acesso: 08.09.2018.

JANOWSKI, AM.; et al. NLRC4 suppresses melanoma tumor progression independently of inflammasome activation. **The Journal of Clinical Investigation**, 126(10):3917-3928, 2016.

JIA, D.; et al. Inflammation is a key contributor to ovarian cancer cell seeding. **Sci Rep**, 17;8(1):12394, 2018.

JIN, L.; et al., Expression of interleukin-1beta in human breast carcinoma. **Cancer**. 80(3):421–434, 1997.

JIN, M.; et al. Successful maintenance therapy with apatinib in platinum-resistant advanced ovarian cancer and literature review. **Cancer Biol Ther**. 15:1-5, 2018.

JONES, PM.; DRAPKIN, R. Modeling High-Grade Serous Carcinoma: How Converging Insights into Pathogenesis and Genetics are Driving Better Experimental Platforms. **Frontiers in Oncology**, v. 3, n. p. 217, 2013.

JOHNSTONE, RW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**. 108:153–164, 2002.

KANG, R.; et al. “Cell death and DAMPs in acute pancreatitis”. **Molecular Medicine**, vol. 20, pp. 466–477, 2014.

KANTONO, M.; GUO. “Inflammasomes and Cancer: The Dynamic Role of the Inflammasome in Tumor Development.” **Frontiers in Immunology** 8:1132, 2017.

KARAN, D.; et al. “Expression Analysis of Inflammasome Sensors and Implication of NLRP12 Inflammasome in Prostate Cancer.” **Scientific Reports**. 4378, 2017.

KARS, MD.; et al. Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds. **Anticancer Research**, v. 26, n. 6B, p. 4559-4568, 2006.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**. 34:637–50, 2011.

KESSLER, M.; et al. The molecular fingerprint of high grade serous ovarian cancer reflects its fallopian tube origin. **Int J Mol Sci.** 25;14(4):6571-6596, 2013.

KIM, EM.; et al. Nuclear and cytoplasmic p53 suppress cell invasion by inhibiting respiratory Complex-I activity via Bcl-2 family proteins. **Oncotarget**, 5:8452–65, 2014.

KOLB, R. Obesity-associated NLRC4 inflammasome activation drives breast cancer progression. **Nature Communications**, 7:13007, 2016.

KURMAN, RJ.; SHIH, IM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. **The American journal of surgical pathology**, v. 34, p. 433–443, 2010.

KURMAN, RJ.; SHIH, IM. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. **International journal of gynecological**. v. 27, p. 151–160, 2008.

KURMAN, RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous. **Ann Oncol.** 24 Suppl 10:x16-21, 2013.

KURMAN, Robert J.; SHIH, IM. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis.

LABIDI-GALY, SI.; et al. High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. **Nat Commun.** 8(1):1093, 2017.

LAMKANFI, M.; DIXIT VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell.** 157:1013, 2014.

LIGHTFIELD, KL.; et al. Differential requirements for NAIP5 in activation of the NLRC4 inflammasome. **Infect Immun.** 79(4):1606–1614, 2011.

LIU, NF.; et al. Role and timing of second-line therapies for patients with recurrent platinum-resistant ovarian epithelial cancer. **Eur J Gynaecol Oncol.** 38(2):266-270, 2017.

LIU, W.; et al. Dual role of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) in tumorigenesis of human melanoma. **J Invest Dermatol.** **133**: 518–527, 2013.

LONGLEY, DB.; JOHNSTON, PG. Molecular mechanisms of drug resistance. **J Pathol.** 205: 275–292, 2005.

MAIURI, AR.; O'HAGAN, HM. Interplay Between Inflammation and Epigenetic Changes in Cancer. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.** 144:69–117, 2016.

MAIURI, AR.; et al. Inflammation-induced DNA methylation of DNA polymerase gamma alters the metabolic profile of colon tumors. **Cancer Metab.** 6:9, 2018.

MAN, S. M.; KANNEGANTI, T.-D. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity TL - 16. **Nature Reviews Immunology.** v. 16 VN - r, n. 1, p. 7–21, 2016.

MARCHINI, S.; et al. Resistance to platinum-based chemotherapy is associated with epithelial to mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer. **Eur J. Cancer.** p. 520–530, 2013.

MARIATHASAN, S.; et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. **Nature.** 430:213–218, 2004.

MARINE, JC.; LOZANO, G. Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. **Cell Death Differ.** 17:93–102, 2010.

MARTINON, F.; et al. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Molecular cell.** 10:417–426, 2002.

MASTERS, SL.; et al. NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells. **Immunity**, 37(6), 1009–1023, 2012.

MATASSA, DS.; et al. Oxidative metabolism drives inflammation-induced platinum resistance in human ovarian cancer. **Cell Death Differ.** 23(9):1542-1554, 2016.

MCDERMOTT, M.; et al. In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. **Frontiers in Oncology**, v. 4, n. 40, p. 1-16, 2014.

MECHAM, RP. Overview of extracellular matrix. **Curr Proto Cell Biol.** 10.1002, 2014.

MEEK, DW. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. **Biochem J.** 469(3):325-346, 2015.

MEINHOLD-HEERLEIN I., HAUPTMANN, S. The heterogeneity of ovarian cancer. Arch **Gynecol Obstet.** 289(2):237-239, 2014.

MENDOZA-RODRÍGUEZ, M.; et al. IL-1b induces up-regulation of BIRC3, a gene involved in chemoresistance to doxorubicin in breast cancer cells. **Cancer Letters**, v.390, p. 39-44, 2017.

MIAO, EA. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. **Nat. Immunol.** 7:569–575, 2006.

MIAO, EA.; et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. **Nat. Immunol.** 11:1136–1142, 2010.

MOR, G.; ALVERO, A. The duplicitous origin of ovarian cancer. **Rambam Maimonides Med J**, v. 4, n. 1, 2013.

MOSER, B.; et al. Chemokines:multiple levels of leukocyte migration control. **Trends Immunol.** 25(2):75-84, 2004.

MOUW, JK.; OU, G. Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 15(12):771–85.10, 2014.

MUINAO, T.; et al. Origins based clinical and molecular complexities of epithelial ovarian cancer. **Int J Biol Macromol.** 118(Pt A):1326-1345, 2018.

MULLER, PA.; et al. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. **J Cell Biol.** 192:209–18, 2011.

MUNROE, M.; KOLESAR, J. Olaparib for the treatment of BRCA-mutated advanced ovarian cancer. **Am J Health Syst Pharm.** 73(14):1037-41, 2016.

NABA, A.; et al. The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. **MolCell Proteomics.** 11(4), 2012.

NEZHAT, FR. et al. **Expert Reviews.** n. September, p. 262–267, 2015.

Ó HAINMHIRE, E.; et al. Mutation or loss of p53 differentially modifies TGF β action in ovarian cancer. **PLoS One.** 9(2): 89553, 2014.

LOUDIN, MJ.; et al. Tumor Cell-Driven Extracellular Matrix Remodeling Drives Haptotaxis during Metastatic Progression. **Cancer Discov.** 6:516–531, 2016.

PANCHANATHAN, R.; et al. Hypoxia primes human normal prostate epithelial cells and cancer cell lines for the NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. **Oncotarget.** 7:28183–94, 2016.

PETITJEAN, A.; et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Hum. Mutat.** 28, 622–629, 2007.

PIECHOTA, J.; et al. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. **Am. J. Pathol.**, 167:1477-1484, 2005.

PIETRO, AD.; et al. “Pro- and Anti-Apoptotic Effects of p53 in Cisplatin-Treated Human Testicular Cancer Are Cell Context-Dependent.” **Cell Cycle.** 11.24, 2012.

POMMIER, Y.; et al. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. **Chem Biol.** 17:421–433, 2010.

POUDEL, B.; GURUNG, P. Collagen, a major extracellular matrix component, promotes NLRP3 inflammasome-dependent and -independent IL-1 β production. **The Journal of Immunology.** 115.9, 2018.

PRAT, J. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**. v. 124, n. 1, p. 1–5, 2014.

RAHNAMOUN, H.; et al. Mutant p53 shapes the enhancer landscape of cancer cells in response to chronic immune signaling. **Nature Communications**. 8, 754, 2017.

RAMALINGAM, P. Morphologic, Immunophenotypic, and Molecular Features of Epithelial Ovarian Cancer. *Oncology (Williston Park)*. 30(2):166-176, 2016.

RATHINAM, VA., FITZGERALD KA. Inflammasome complexes: emerging mechanisms and effector functions. **Cell**. 165:792–800, 2016.

SANTILLAN, A.; et al. Differences of chemoresistance assay between invasive micropapillary/low-grade serous ovarian carcinoma and high-grade serous ovarian carcinoma. **Int J Gynecol Cancer**. May-Jun;17(3):601-6, 2007.

SAVANT, S. et al. “The Role of Inflammation and Inflammatory Mediators in the Development, Progression, Metastasis, and Chemoresistance of Epithelial Ovarian Cancer.” *Cancers* 10.8 :251, 2018

SAWAI, H.; et al. Interleukin-1alpha enhances integrin alpha(6)beta(1) expression and metastatic capability of human pancreatic cancer. **Oncology**. 65:167–173, 2003.

SCHMITT, CA.;. et al. Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. **Nat Med**. 6:1029–1035, 2000.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**. 140: 821–832, 2010.

SHERMAN-BAUST, CA.; et al. Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. **Cancer Cell**, v. 3, n. 4, p. 377–386, 2003.

SPANDANA, R.; et al. NLRP3 inflammasome activation inhibitors in inflammation-associated cancer immunotherapy: an update on the recent patents. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug* **Discovery**, v. 13, p.106-117, 2018.

STRASSER, A.; et al. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. **Nature**. 22;331-3, 1990.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. **Nat. Rev. Immunol.** 18:309–324, 2018.

TANG, D.; et al. “Endogenous HMGB1 regulates autophagy,” **Journal of Cell Biology**. vol. 190, no. 5, pp. 881–892, 2010.

TARASSISHIN, L.; et al. Aberrant Expression of Interleukin-1beta and Inflammasome Activation in Human Malignant Gliomas. **PLoS One**. 9:e103432, 2014.

TEMKIN, SM.; et al. Outcomes from ovarian cancer screening in the PLCO trial: Histologic heterogeneity impacts detection, overdiagnosis and survival. **Eur J Cancer**. 87:182-188, 2017.

THI, HTH.; HONG, S. Inflammasome as a Therapeutic Target for Cancer Prevention and Treatment. **Journal of Cancer Prevention**. 22(2):62-73, 2017.

TING, JP.; DAVIS, BK. CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. **Annu Rev Immunol**. 23:387–414, 2005.

TULOTTA, C.; OTTEWELL, P. “The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis” **Endocrine-related cancer** vol. 25,7 :R421-R434, 2018.

VASEVA, AV.; MOLL, UM. The mitochondrial p53 pathway. **Biochim Biophys Acta**. 1787:414–20, 2009.

VASEY, PA.; et al. Cisplatin, camptothecin, and Taxol sensitivities of cells with p53-associated multidrug resistance. **Mol. Pharmacol.**, **50**: 1536-1540, 1996.

VAUGHAN, S.; et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. **Nature reviews**. Cancer, v. 11, n. 10, p. 719–25, 2011.

VAUX, DL.; et al. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. **Nature**. 335:440–442, 1988.

VORONOV, E.; et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci.** 100:2645–2650, 2003.

VORONOV, E.; APTE, R.N. IL-1 in colon inflammation, colon carcinogenesis and invasiveness of colon cancer. **Cancer Microenviron.** v. 8, p. 187–200, 2015.

WANG, M.; et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **J Cancer.** 8(5):761-773, 2017.

WATANABE, T.; et al. Production of IL-1beta by ovarian cancer cells induces mesothelial cell beta1-integrin expression facilitating peritoneal dissemination. **J Ovarian Res.** v. 5, p. 7, 2012.

WEI, Q.; et al. Deregulation of the NLRP3 inflammasome in hepatic parenchymal cells during liver cancer progression. **Lab Invest.** 94:52, 2014.

WILLIAMS, TM.; et al. “The NLRP1 inflammasome attenuates colitis and colitis-associated tumorigenesis,” **Journal of Immunology.** v. 194, no. 7, pp. 3369–3380, 2015.

WILMES, A.; et al. Mechanism of cisplatin proximal tubule toxicity revealed by integrating transcriptomics, proteomics, metabolomics and biokinetics. **Toxicol In Vitro.** 30(1 Pt A):117-127, 2015.

WIND, N. S.; HOLEN, I. Multidrug Resistance in Breast Cancer: From in vitro Models to Clinical Studies. **International Journal of Breast Cancer,** v 2011, p.1-12, 2011.

WOOLERY, KT.; et al. BRCA1 185delAG mutation enhances interleukin-1 β expression in ovarian surface epithelial cells. **BioMed Research International,** v. 20, 2015.

XIA, Y.; et al. NF- κ B, an active player in human cancers. **Cancer Immunology Research.** 2(9), 823–830, 2014.

XU, Y.; et al. Mycoplasma hyorhinis activates the NLRP3 inflammasome and promotes migration and invasion of gastric cancer cells. **PLoS One.** 8:77955, 2013.

YOGOSAWA, S.; YOSHIDA, K. Tumor suppressive role for kinases phosphorylating p53 in the DNA damage-induced apoptosis. **Cancer Sci.** 2018.

ZAKI, MH.; et al. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. **Immunity.** 32, 379-91, 2010.

ZHAI, Z.; et al. NLRP1 promotes tumor growth by enhancing inflammasome activation and suppressing apoptosis in metastatic melanoma. **Oncogene.** 36(27), 3820–3830, 2017.

ZHANG, GN.; et al. TP53 K351N mutation-associated platinum resistance after neoadjuvant chemotherapy in patients with advanced ovarian cancer. **Gynecol Oncol.** 132:752-7, 2014.

ZITVOGEL, L.; et al. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. **Nat Immunol.** 13:343–51, 2012.